

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



EFECTO DE DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO  
SOBRE LA TOXICIDAD Y ESPORULACION DE  
*BACILLUS THURINGIENSIS* var. *ISRAELENIS*

CLAUDIO ADOLFO AVIGNONE ROSSA

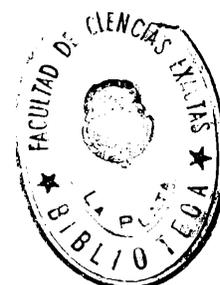
TESIS DOCTORAL  
1994

ADONACION.....  
A.....  
Fecha..... 12 OCT. 1995  
Inv. B..... Inv. 54379

|  |
|--|
|  |
|  |
|  |

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



EFFECTO DE DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO  
SOBRE LA TOXICIDAD Y ESPORULACION DE  
*BACILLUS THURINGIENSIS* var. *ISRAELENSIS*

CPB 9/11

CLAUDIO ADOLFO AVIGNONE ROSSA

TESIS DOCTORAL  
1994

Este trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas, orientación Industrias Bioquímicas, fue realizado bajo la Dirección del Prof. Dr. Carlos F. Mignone.

El desarrollo de las tareas experimentales fue llevado a cabo en los laboratorios del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas UNLP.

Las Becas concedidas por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas permitieron la realización de este trabajo. Agradezco a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por autorizar el desarrollo de las tareas experimentales en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI). Deseo expresar mi especial reconocimiento a los compañeros del CINDEFI, en particular a Jorge Arcas, y del Área Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas.

Esta Tesis no podría haberse realizado sin el constante y generoso aporte de ideas y sugerencias de Carlos Mignone. Espero no haber defraudado su confianza. Asimismo, el apoyo brindado por Víctor de Vargas, su disposición permanente y su capacidad facilitaron la tarea experimental.

El cariño y apoyo de mi familia durante todos estos años de estudio hicieron posible alcanzar este objetivo.

Debo agradecer el entusiasmo y el aliento dados por Victoria, compañera de lucha y amiga. La discusión constante y el intercambio de opiniones, dudas y certezas durante todas las horas compartidas permitieron culminar este trabajo, y por eso deseo dedicárselo.

Los resultados presentados en este trabajo han sido publicados, en forma parcial o total, en:

- Avignone Rossa *et al.* (1990). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6, 27 - 31.  
Avignone Rossa *et al.* (1992). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 301 - 304  
Mignone y Avignone Rossa (1993). *Proc. Biochem.* 28, 405 - 410  
Avignone Rossa y Mignone (1993) *Biotechnol. Lett.* 15, 295 - 300  
Avignone Rossa y Mignone (1994). *Mol. Biotechnol.* (en prensa).

# INDICE

## 1. INTRODUCCION

|   |    |
|---|----|
| 1.1. Control microbiano de insectos: Historia   | 2  |
| 1.2. Las bacterias como patógenos de insectos: Comparación de bacterias con otros patógenos microbianos | 3  |
| 1.3. <i>Bacillus thuringiensis</i>  | 5  |
| 1.3.1. Descubrimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i>  | 5  |
| 1.3.2. Aspectos microbiológicos   | 6  |
| 1.3.3. Clasificación y taxonomía  | 7  |
| 1.3.4. Bioquímica   | 8  |
| 1.3.4.1. Metabolismo del carbono  | 8  |
| 1.3.4.2. Metabolismo del nitrógeno  | 9  |
| 1.3.5. Plásmidos y toxinas  | 9  |
| 1.3.6. Clasificación de los genes   | 9  |
| 1.3.7. Otras toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>   | 12 |
| 1.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> como agente de control de vectores           | 13 |
| 1.4.1. Los dípteros como plaga sanitaria y doméstica  | 13 |
| 1.4.2. Control microbiano de mosquitos  | 14 |
| 1.5. Producción y uso comercial de bioinsecticidas a base de <i>Bacillus thuringiensis</i>              | 16 |
| 1.5.1. Destino de los esporos y cristales liberados al ambiente   | 17 |
| 1.5.2. Rol en el ambiente   | 18 |
| 1.5.3. Función de la $\delta$ -endotoxina   | 20 |
| 1.6. Objetivos de este trabajo  | 21 |

## 2. CARACTERIZACION DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS*.

|  |    |
|--|----|
| 2.1. Nutrición y nutrientes                  | 23 |
| 2.1.1. Requerimientos de carbono y nitrógeno | 23 |
| 2.1.2. Medios definidos                      | 24 |
| 2.1.3. Macronutrientes                       | 24 |
| 2.1.4. Factores de crecimiento               | 26 |
| 2.2. El caso de <i>Bacillus</i>              | 27 |
| 2.2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>         | 27 |
| 2.3. Materiales y métodos                    | 30 |
| 2.3.1. Microorganismo                        | 30 |
| 2.3.2. Inóculos                              | 30 |

|  |    |
|--|----|
| 2.3.3. Medio de cultivo  | 30 |
| 2.3.4. Condiciones de cultivo  | 30 |
| 2.3.5. Determinaciones analíticas  | 31 |
| 2.3.5.1. Biomasa   | 31 |
| 2.3.5.2. Recuento de esporos   | 31 |
| 2.3.5.3. Glucosa   | 31 |
| 2.3.5.4. Nitrógeno total   | 31 |
| 2.3.5.5. Determinación de amonio   | 32 |
| 2.3.5.6. $\delta$ -endotoxina  | 32 |
| 2.4. Resultados y discusión  | 33 |
| 2.4.1. Fuentes de nitrógeno, factores de crecimiento y otros nutrientes              | 33 |
| 2.4.2. Influencia de la relación entre la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno | 39 |
| 2.4.3. Relación entre extracto de levadura y sulfato de amonio                       | 46 |
| 2.5. Conclusiones  | 48 |
| <br>   |    |
| 3. CULTIVOS BATCH DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> VAR. <i>ISRAELENSIS</i>           |    |
| 3.1. Introducción  | 50 |
| 3.2. Ensayos en tanques agitados   | 52 |
| 3.2.1. Parámetros de crecimiento   | 52 |
| 3.2.2. Objetivos de esta etapa   | 53 |
| 3.3. Materiales y métodos  | 53 |
| 3.3.1. Microorganismo  | 53 |
| 3.3.2. Inóculos  | 53 |
| 3.3.3. Medios de cultivo   | 54 |
| 3.3.4. Condiciones de cultivo  | 54 |
| 3.3.5. Análisis de gases   | 55 |
| 3.3.6. Oxígeno disuelto  | 55 |
| 3.3.7. Determinaciones analíticas  | 55 |
| 3.4. Resultados y discusión  | 56 |
| 3.4.1. Medios concentrados   | 59 |
| 3.4.2. Ensayos de dilución   | 64 |
| 3.5. Conclusiones  | 65 |
| <br>   |    |
| 4. CULTIVOS DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE AIREACION |    |
| 4.1. Introducción  | 67 |
| 4.2. Aspectos fisiológicos   | 68 |
| 4.2.1. El rol del oxígeno en el metabolismo de <i>Bacillus</i>                       | 68 |
| 4.3. Materiales y métodos  | 71 |

|   |    |
|---|----|
| 4.3.1. Microorganismo   | 71 |
| 4.3.2. Inóculos   | 71 |
| 4.3.3. Medio de cultivo   | 71 |
| 4.3.4. Condiciones de cultivo   | 71 |
| 4.3.5. Determinaciones analíticas                                       | 72 |
| 4.3.5.1. Oxígeno disuelto   | 72 |
| 4.3.5.2. Composición del gas efluente del biorreactor                   | 72 |
| 4.4. Resultados y discusión   | 72 |
| 4.4.1. Parámetros de crecimiento  | 79 |
| 4.4.2. Esporulación   | 81 |
| 4.4.3. El suministro de oxígeno y la producción de $\delta$ -endotoxina | 83 |
| 4.4.4. Experimentos con aireación interrumpida                          | 84 |
| 4.5. Conclusiones   | 86 |

## 5. CULTIVOS BATCH ALIMENTADO

|   |     |
|---|-----|
| 5.1 Introducción  | 88  |
| 5.1.1. Características de un cultivo batch alimentado                   | 88  |
| 5.1.2. Utilidad de las técnicas de batch alimentado                     | 89  |
| 5.1.3. Clasificación de las técnicas de cultivo en batch alimentado     | 89  |
| 5.1.4. Aplicaciones de procesos batch alimentado                        | 91  |
| 5.2. Teoría matemática del batch alimentado sin control retroalimentado | 93  |
| 5.2.1. El modelo matemático   | 93  |
| 5.2.2. Cultivos batch alimentado con velocidad de alimentación variable | 95  |
| 5.2.2.1. Batch alimentado lineal  | 96  |
| 5.2.2.2. Batch alimentado exponencial                                   | 98  |
| 5.2.2.3. El cultivo extendido   | 99  |
| 5.2.2.5. Nomenclatura   | 102 |
| 5.2.3. Cultivos batch alimentado de <i>Bacillus thuringiensis</i>       | 103 |
| 5.3. Materiales y métodos   | 103 |
| 5.3.1. Microorganismo y medio de mantenimiento                          | 103 |
| 5.3.2. Medios y condiciones de cultivo                                  | 103 |
| 5.3.3. Determinaciones analíticas                                       | 105 |
| 5.3.4. Bioensayos   | 105 |
| 5.3. Resultados y discusión   | 106 |
| 5.3.1. Cultivos batch alimentado lineales                               | 106 |
| 5.3.2. Cultivos batch alimentado exponenciales                          | 111 |
| 5.3.3. Actividad tóxica   | 120 |
| 5.4. Conclusiones   | 125 |

|   |     |
|---|-----|
| 6. ESTEQUIOMETRIA DE LOS CULTIVOS DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i><br>VAR. <i>ISRAELENSIS</i> |     |
| 6.1. Introducción   | 127 |
| 6.2. Materiales y métodos   | 131 |
| 6.2.1. Microorganismo y medios de cultivo   | 131 |
| 6.2.2. Cultivos batch y batch alimentado  | 132 |
| 6.2.3. Determinaciones analíticas   | 132 |
| 6.2.2.1. Determinación de ácidos orgánicos  | 132 |
| 6.3. Resultados y discusión   | 134 |
| 6.3.1. Cultivo batch  | 134 |
| 6.3.2. Cultivo batch alimentado exponencial ( $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$ )                    | 135 |
| 6.3.3. Cultivo batch alimentado exponencial ( $\mu = 0.5 \text{ h}^{-1}$ )                    | 135 |
| 6.4. Conclusiones   | 136 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS   | 137 |

Entre el que venció mil millares de  
hombres en la batalla y aquel que se  
venció a sí mismo, éste último es el  
vencedor más grande.

Buda

---

# 1 Introducción

---

## 1.1.CONTROL MICROBIANO DE INSECTOS: HISTORIA

Las enfermedades que afectan a insectos, en particular a aquellos útiles para el hombre, fueron de interés desde los primeros siglos de nuestra era: Aristóteles, en la *Historia animalum*, hace una descripción de las enfermedades de las abejas, y en la literatura griega y romana pueden encontrarse observaciones acerca de morbilidad entre gusanos de seda. Informes de este tipo también se hallan en trabajos de naturalistas de la Edad Media. El primer documento de carácter científico acerca de enfermedades de insectos es el de de Reaumur, en 1742.

La implicancia comercial de estas enfermedades promovió que, a principios del siglo 19, Kirby y Spence incluyeran un capítulo llamado *Diseases of insects* en su texto *An Introduction to Entomology*. El estudio de la patología de insectos en su forma actual tuvo su comienzo en el siglo pasado, bajo la influencia de Bassi, Cheshire y Cheyne, y Pasteur. Estos investigadores estudiaron enfermedades de insectos beneficios para el hombre, y son considerados los fundadores del campo de estudio de las enfermedades infecciosas. En 1835 Bassi demostró por vez primera que un microorganismo, el hongo *Beauveria bassiana*, podía causar una enfermedad en un animal, el gusano de seda (*Bombyx mori*). Bassi no sólo contribuyó al entendimiento de las enfermedades infecciosas sino que fue el primero en proponer el control de insectos mediante microbios. Asimismo, tanto Pasteur (1870) como Cheshire y Cheyne (1885) estudiaron enfermedades que afectaban a insectos benéficos, haciendo énfasis en aspectos del control de dichas enfermedades en poblaciones de insectos de importancia comercial, entre ellos, como es obvio, abejas (*Apis mellifera*) y gusanos de seda.

Una contribución mayor fue realizada por Metchnikoff, quien utilizó al hongo *Metarrhizium anisopliae* contra plagas agrícolas tales como el escarabajo de los granos (*Anisoplia austriaca*) y el gorgojo de la remolacha azucarera (*Cleonus punctiventris*). Con estos trabajos, junto con los de Krassilstchick, Metchnikoff pudo demostrar por vez primera que un patógeno específico, aislado a partir de un insecto, podía ser producido en gran escala y ser aplicado como "insecticida microbiano". El éxito de Metchnikoff dio origen a los trabajos de Gaillot, en Francia, y los de Forbes y Snow, en Estados Unidos, donde se emplearon cepas de otro hongo, *Beauveria bassiana*, para el control de las plagas agrícolas *Pieris brassicae* y *Blissus leucopterus*.

El uso de bacterias para controlar insectos fue intentado por vez primera por d'Herelle en 1914, 45 años después de la descripción de la enfermedad del gusano de seda hecha por Pasteur. Debido a que los resultados del control no fueron uniformes hubo una relativa pérdida del interés en el control por bacterias. Hubo que esperar otros 25 años para que White y Dutky intentaran con éxito controlar una plaga, *Popillia japonica* (escarabajo japonés), que desde Japón había llegado a Estados Unidos causando serios perjuicios económicos en sembrados y pasturas, mediante el empleo de *Bacillus popilliae*, agente causal de la así llamada "enfermedad lechosa" (Dutky 1959). Este fue un hito en la historia del control bacteriano, el cual fue continuado por intensos estudios con una bacteria similar, *Bacillus thuringiensis*, la cual mostraba mucha mayor efectividad y especificidad sobre distintos insectos.

En la década de los años `50 comenzaron a realizarse estudios sobre el control de insectos empleando virus como agentes causantes de enfermedades en insectos. Se han descrito virus entomopatogénicos caracterizados por un alto grado de especificidad; entre ellos se han empleado DNA virus (baculovirus, parvovirus, poxvirus) y RNA virus (virus de la polihedrosis citoplásmica, rabdovirus, enterovirus). Es también destacable la patogenicidad hacia insectos por parte de protozoarios y de nematodos, los cuales son empleados en el control integrado de plagas. Asimismo debe hacerse mención de la actividad insecticida de ciertos rickettsiales.

## 1.2. LAS BACTERIAS COMO PATOGENOS DE INSECTOS: Comparación de bacterias con otros patógenos microbianos.

La ubicuidad de los microorganismos hace que no sea sorprendente encontrar un gran número de ellos como agentes de patologías asociadas a insectos. Como se dijo antes, diversas clases de microorganismos son patógenos de insectos, entre ellos virus, micoplasmas, rickettsiales, protozoarios, bacterias, hongos y virus.

En los últimos 50 años han sido aisladas y clasificadas un gran número de bacterias patógenas para insectos. La mayoría de ellas pertenecen a las familias *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Micrococcaceae* y *Bacillaceae*. Los patógenos más comunes se encuentran detallados en la Tabla 1.1.

---

**Tabla 1.1.** Bacterias patógenas para insectos y principales insectos afectados
 

---

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | langosta  |
| <i>Pseudomonas septica</i>      | escarabajos   |
| <i>Serratia marcescens</i>      | larvas de diversos insectos                                       |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>   | lepidópteros  |
| <i>Salmonella enteritidis</i>   | polilla de la cera  |
| <i>Shigella dysenteriae</i>     | lepidópteros  |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>   | polilla de la cera  |
| <i>Streptococcus faecalis</i>   | moscas  |
| <i>Clostridium perfringens</i>  | polilla de la cera  |
| <i>Clostridium brevifaciens</i> | lepidópteros  |
| <i>Bacillus cereus</i>          | coleópteros, himenópteros,<br>lepidópteros                        |
| <i>Bacillus larvae</i>          | abejas  |
| <i>Bacillus popilliae</i>       | escarabajos   |
| <i>Bacillus lentimorbus</i>     | lepidópteros  |
| <i>Bacillus sphaericus</i>      | dípteros  |
| <i>Bacillus thuringiensis</i>   | lepidópteros, dípteros,<br>escarabidos, nematodos,<br>coleópteros |

Entre todos los patógenos descritos en la Tabla 1.1 se destaca *Bacillus thuringiensis*. Este microbio presenta patogenicidad frente a distintos tipos de insectos, con una muy alta especificidad para lepidópteros, coleópteros y dípteros. Estos microorganismos esporulados, pertenecientes a la familia *Bacillaceae*, presentan el más alto potencial para ser utilizados en el manejo y control de poblaciones de insectos plaga, y por lo tanto han recibido la mayor atención desde el punto de vista comercial.

### 1.3. *BACILLUS THURINGIENSIS*

#### 1.3.1. DESCUBRIMIENTO DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

En 1902, en Japón, Ishiwata, en medio de estudios destinados al control de enfermedades epidémicas en insectos con importancia económica, aisló una bacteria esporulada aeróbica presente en gusanos de seda muertos. Ishiwata llamó a los bacilos esporulados "*Sotto-bacillen*" (bacilos del colapso súbito). Sin embargo no se realizaron estudios en detalle hasta 1915, cuando Aoki y Chigasaki retomaron el estudio de la enfermedad del gusano de seda causada por los bacilos.

Al mismo tiempo Berliner (1915), en Alemania, aisló un bacilo a partir de larvas muertas de polilla de la harina (*Anagasta kuehniella*), y lo llamó *Bacillus thuringiensis*, por el *länder* de Thuringia donde realizó los estudios. Mattes, en 1927, reaisló el bacilo y describió con gran detalle la enfermedad causada.

Todos estos investigadores realizaron observaciones cuya importancia no fue reconocida hasta mucho más tarde. Aoki y Chigasaki descubrieron que sólo cultivos viejos, donde la esporulación era total, eran capaces de causar la enfermedad en gusanos por ingestión, y notaron la extrema rapidez con que los síntomas eran observados, llegando a la parálisis dentro de una hora luego de la ingestión de los cultivos esporulados (la *muerte súbita*, según Ishiwata) y sugirieron la presencia de una toxina. Berliner y Mattes observaron que las células esporuladas contenían un segundo cuerpo refringente, de forma romboidal no regular. Al desarrollarse el espora podía observarse un gránulo esférico que se volvía romboidal al llegar el espora a su madurez. Berliner lo llamó *Restkörper*, y Mattes sugirió que era parte del aparato nuclear de la célula bacteriana.

Estas observaciones permanecieron durante años como curiosidades, y su relación con el uso de las bacterias para controlar poblaciones permaneció latente por cerca de 20 años. En 1953, en Canadá, Hannay (1953), realizando estudios sobre esporulación en *Bacillus thuringiensis*, redescubrió el *Restkörper*, observando que, sin excepción, la esporulación era acompañada por la formación de un cuerpo parasporal con forma de diamante. Cada esporangio contenía un espora y un cristal, y Hannay sugirió que estos cuerpos parasporales estaban involucrados en las enfermedades. Otro investigador canadiense, Angus (1954), comenzó a elucidar el rol del cristal en la patogenicidad. Luego de una serie de estudios (Angus 1954,

1956) confirmó los supuestos de Aoki y Chigasaki y la sugerencia de Hannay respecto de la relación patogenicidad-cristal. Concluyó que el principio tóxico asociado con las inclusiones cristalinas no era una exotoxina típica, sino que requería de solubilización para transformarse en activa, y que esto sólo se lograba tratando los cristales con álcali o con jugo intestinal del insecto. Angus postuló que la parálisis no es causada por el crecimiento del microorganismo en el tejido del hospedador (Angus 1956).

Al ingerir el cristal proteico, la larva del insecto susceptible puede morir sufriendo una patología característica. El curso usual de una infección bacteriana (ingestión de la célula vegetativa o esporos, reproducción de la bacteria en el tejido del hospedador, producción de factores invasivos por el patógeno y producción de toxina dentro del hospedador) no requiere del estricto cumplimiento de esos pasos para que ocurra una toxemia. La ingestión de la toxina formada fuera del hospedador es suficiente para causar la muerte. Esta capacidad del cristal para matar de modo súbito pone a los bacilos en un pie de igualdad con los insecticidas químicos, y es posible emplearlos en el control de poblaciones de insectos susceptibles.

En el período transcurrido entre los trabajos de Mattes y los de Hannay los estudios acerca de *Bacillus thuringiensis* se refirieron sin excepción al control de insectos a campo. En Gran Bretaña, Huzs (1931) llevó a cabo ensayos para control del barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis*) con buenos resultados, y Jacobs (1950) uso el preparado comercial *Sporéine* (Francia, 1938) para proteger harinas de la infestación por polillas. En los Estados Unidos, Steinhau (1951) usó la cepa de Mattes para controlar la oruga de la alfalfa (*Colias eurytheme*), y estableció las ventajas del uso de la toxina contra la plaga.

### 1.3.2. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva, esporulada, que, como se dijo antes, es capaz de sintetizar una toxina, llamada  $\delta$ -endotoxina, de carácter glicoproteico, que se presenta como un cuerpo cristalino llamado "cristal", "cuerpo parasporal" o "inclusión parasporal". Esta característica es presentada también por *Bacillus popilliae* y por algunas cepas de *Bacillus sphaericus*.

Por observación microscópica se puede ver que los cristales presentan una forma característica, que puede variar entre las distintas subespecies. Las proteínas que componen los cristales presentan una alta toxicidad y una sorprendente especificidad para diversas plagas. En los últimos treinta años fue empleado casi con exclusividad para el control de lepidópteros, plagas agrícolas cuyas larvas, al ingerir esta toxina, sufren una serie de fenómenos que las conducen a la muerte en pocas horas. Las ventajas de *Bacillus thuringiensis* como insecticida pueden resumirse en: a) su alta especificidad, sin afectar mamíferos o insectos no blancos; b) la escasa o nula resistencia (aunque han sido publicados algunos datos sobre resistencia adquirida); c) la adaptabilidad a varios tipos de formulaciones, pudiéndose incorporar cebos o estimulantes para aumentar la eficacia; d) las posibilidades de incorporación de mejoras tecnológicas en la producción; e) las posibilidades de mejoras genéticas o de selección de cepas para incrementar la actividad. Las desventajas son: a) el estrecho espectro de insectos afectados; b) la necesidad de tiempos de aplicación apropiados debido al más lento efecto respecto de los insecticidas químicos; c) la influencia de la ingestión sobre la actividad, y la dependencia de aquella de los factores climáticos y ambientales; d) aunque decrecientes, costos mayores que los de los insecticidas químicos.

### 1.3.3. CLASIFICACION Y TAXONOMIA

Según el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8va Edición, *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) es miembro del grupo I del género *Bacillus*, junto con *Bacillus subtilis*, *cereus*, *licheniformis*, *megaterium* y *anthracis*. Es un bacilo Gram positivo, de 2 - 5  $\mu\text{m}$  de largo y 1 - 1.2  $\mu\text{m}$  de ancho, con espora elíptica central o subterminal. Es móvil debido a la presencia de flagelos peritricos. Se divide por fisión binaria, ocurriendo en cadenas. Se distingue de *Bacillus cereus* por la producción, durante la esporulación, de un cuerpo parasporal cristalino, de naturaleza proteica, que le confiere actividad tóxica hacia larvas de diversos insectos.

Los numerosos aislamientos de *Bacillus thuringiensis* difieren unos de otros de modo considerable, por lo que es necesario clasificarlos en serotipos y variedades. En 1987 había reportadas 27 variedades, clasificadas en base a antígenos flagelares (Antígenos H) y a pruebas bioquímicas. El trabajo fundamental de clasificación fue realizado por de Barjac y Bonnefoi (1962). La clasificación serológica es coherente con la clasificación bioquímica empleada con anterioridad a

los ensayos de aglutinación flagelar. En la actualidad se utilizan subfactores serológicos y pruebas bioquímicas para la subdivisión de los serotipos en variedades y subespecies. El número de serotipos y variedades clasificadas ha aumentado, yendo de 14 serotipos divididos en 19 variedades en 1982 a 27 variedades en 1987 y, ya en 1990, de Barjac reportaba la clasificación de 34 variedades en un total de 1720 cepas en la colección del Instituto Pasteur, en París. De ellas, 228 cepas corresponden al serotipo H-14, es decir *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

Otro tipo de clasificación fue el propuesto por Norris (1964), basado en el perfil de esterazas presentes en *Bacillus thuringiensis*. Esta clasificación también es coincidente con aquella basada en los serotipos.

Para relacionar cada variedad con su patogenicidad se intentó agrupar a *Bacillus thuringiensis* según los antígenos del cristal. Cuando se preparan del mismo modo, los antígenos presentes en el cristal permiten una caracterización unívoca de las cepas, y es una herramienta adecuada tanto para la subdivisión taxonómica de las variedades como para la identificación de cepas. Hay una correlación entre antígenos del cristal y el serotipo para más del 85 % de las cepas estudiadas (Krywienczyk *et al.* 1977). Variaciones de esta clasificación son las propuestas por Yamamoto (1983), que utilizó técnicas de *rocket* inmunolectroforesis, Lynch y Baumann (1985), quienes usaron técnicas de doble inmunodifusión y microfijación de complemento, y Smith (1987), que ensayó doble inmunodifusión, ELISA, y *Western blotting*. Con esta última técnica, Smith logró reducir a dos tipos de cristales distintos: Grupo I, con actividad hacia larvas de Lepidópteros, y Grupo II, con actividad hacia larvas de Dípteros.

#### 1.3.4. BIOQUIMICA

1.3.4.1. METABOLISMO DEL CARBONO. Durante el crecimiento vegetativo, *Bacillus thuringiensis* metaboliza los azúcares a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas para dar ácidos, que luego son oxidados por las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Nickerson *et al.* 1974). *Bacillus thuringiensis* no presenta actividad  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, es decir que el ciclo de los ácidos tricarbónicos es incompleto (Aronson *et al.* 1975), modificado por la presencia de la ruta del ácido  $\gamma$ -aminobutírico. La velocidad de catabolismo de los ácidos formados es menor si hay aminoácidos presentes en el medio (Bulla *et al.* 1971), pues estos pueden actuar como fuentes de carbono y de nitrógeno.

Una característica importante es la elevada producción de proteasas que se observa al comenzar a metabolizarse los ácidos. Este es un evento asociado a la iniciación de la esporulación (Egorov *et al.* 1984; Bibilos y Andrews 1988).

1.3.4.2. METABOLISMO DEL NITRÓGENO. *Bacillus thuringiensis* debe movilizar gran parte del nitrógeno asimilado durante el crecimiento vegetativo cuando comienza la síntesis del cristal y de las enzimas específicas de la esporulación. Los aminoácidos predominantes son alanina y glutamato, y la actividad transaminasa principal es la de la glutamato oxaloacetato transaminasa, y en menor extensión glutamato piruvato transaminasa y glutamato deshidrogenasa. La asimilación de amonio está catalizada por alanina deshidrogenasa y por glutamato deshidrogenasa (Borris y Aronson 1969; Aronson *et al.* 1975). No se ha informado la presencia del sistema glutamato sintasa - glutamina sintetasa.

#### 1.3.5. PLASMIDOS Y TOXINAS.

Una de las claves para los estudios relacionados con la toxicidad y la especificidad de *Bacillus thuringiensis* es la caracterización de los genes que codifican para la  $\delta$ -endotoxina. Estudios al respecto se han realizado desde hace más de una década; así, se ha podido determinar que la información genética para las proteínas del cristal está presente en uno o más plásmidos de cerca de 72 MDa (Gonzalez *et al.* 1982; Faust *et al.* 1983). Los genes han sido caracterizados, y se conocen las secuencias de nucleótidos de las regiones promotoras, la naturaleza del sitio de unión y secuencias de consenso. El control de la expresión ocurre a nivel de la transcripción. El gen es transcrito por una RNA polimerasa específica de la esporulación, pero no por la de la forma vegetativa, debido a la incapacidad de esta última para unirse al sitio del promotor (Wong *et al.* 1983; Klier *et al.* 1983).

#### 1.3.6. CLASIFICACION DE LOS GENES.

Luego de una relativa anarquía en la descripción y caracterización de los genes, Hofte y Whiteley (1989) propusieron clasificar los genes de las proteínas del cristal según su estructura y actividad tóxica. Los genes se clasificaron en cuatro tipos: cry I, cry II, cry III y cry IV, a los que se deben agregar dos tipos nuevos, cry V y cry VI (Feitelson *et al.* 1992). La clasificación se presenta en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Clasificación de los genes de la  $\delta$ -endotoxina presentes en diferentes variedades de *Bacillus thuringiensis* (adaptado de Hofte y Whiteley 1989)

| Clase  | Subclase | PM<br>(kDa) | Especificidad             | variedad  |
|--------|----------|-------------|---------------------------|---|
| cry I  | IA(a)    | 130 - 140   | Lepidópteros              | <i>kurstaki</i> HD1,<br><i>sotto</i> , <i>aizawai</i>     |
|        | IA(b)    |             |                           | <i>berliner</i> , <i>aizawai</i> ,<br><i>kurstaki</i> HD1 |
|        | IA(c)    |             |                           | <i>kurstaki</i> HD73                                      |
|        | IB       |             |                           | <i>thuringiensis</i><br>HD2                               |
|        | IC       |             |                           | <i>entomocidus</i> ,<br><i>aizawai</i>                    |
|        | ID<br>IE |             |                           | <i>aizawai</i>  |
| cryII  | IIA      | 63          | Lepidopteros,<br>Dipteros | <i>kurstaki</i> HD263                                     |
|        | IIB      |             |                           | <i>kurstaki</i> HD1                                       |
|        | IIC      |             |                           | 61  |
| cryIII | IIIA     | 72          | Colcópteros               | <i>san diego</i> ,<br><i>tenebrionis</i> ,                |
|        | IIIB     |             |                           | <i>tolworthi</i>  |
| cryIV  | IVA      | 135         | Dipteros                  | <i>israelensis</i>  |
|        | IVB      | 128         |                           | <i>israelensis</i>  |
|        | IVC      | 78          |                           | <i>israelensis</i>  |
|        | IVD      | 72          |                           | <i>israelensis</i>  |
| cryV   | VA(a)    | ?           | Nemátodos                 |   |
|        | VA(b)    |             |                           |   |
|        | VB       |             |                           |   |
|        | VC       |             |                           |   |
| cryVI  | VIA      | ?           | Nemátodos                 |   |
|        | VIB      |             |                           |   |
| cyt    | cyt A    | 27          | Dipteros,<br>citólítico   | <i>israelensis</i> ,<br><i>morrisoni</i>                  |

Todos los genes pertenecientes a la clase I codifican para polipéptidos de alrededor de 130 kDa, específicos para larvas de lepidópteros. En los genes pertenecientes a este grupo pueden encontrarse al menos veinte secuencias distintas, y las proteínas codificadas forman inclusiones de forma bipiramidal característica. Los polipéptidos deben ser activados por proteasas del intestino de la larva para alcanzar la toxicidad (Tyrrel *et al.* 1981; Tojo y Aizawa 1983).

Los genes de los grupos II y III codifican para polipéptidos de alrededor de 70 kDa, activos frente a lepidópteros (cry II) y coleópteros (cry III). Los del grupo II están presentes en, al menos, 15 cepas de las variedades *kurstaki*, *thuringiensis*, *tolworthi* y *kenyae* (Yamamoto *et al.* 1988). Se han descrito dos subgrupos (cry IIA y cry IIB) que presentan entre sí una muy elevada homología (Widner y Whiteley 1989).

Los genes del grupo III (IIIA y IIIB) codifican para proteínas activas contra coleópteros. El polipéptido codificado tiene un peso molecular de 72 kDa, y es procesado por proteasas para dar un polipéptido activo de 66 kDa.

A diferencia de lo que ocurre en otras variedades de *Bacillus thuringiensis*, el cristal de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* comprende varias proteínas, de pesos moleculares predichos de 130, 128, 78 y 72 kDa, codificadas por los genes cry IVA, cry IVB, cry IVC y cry IVD, las que junto con la proteína de 28 kDa, codificada por el gen *cytA*, se ensamblan para formar el cristal ovoide característico de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

Los genes cry IVA y cry IVB son muy similares a los genes cry I presentes en cepas activas contra Lepidópteros. Las regiones C-terminales de las proteínas por ellos codificadas son casi idénticas, mientras que las regiones N-terminales muestran mayor variación, aunque hay cinco dominios de alta conservación, comunes a las proteínas Cry I, III, IVA, IVB, e IVC. Esto implica que las regiones tóxicas de las proteínas residen en las mitades N-terminales variables, lo cual ha podido ser confirmado por análisis de delección (Chunjatopornchai *et al.* 1988; Delecleuse *et al.* 1988).

Las proteínas Cry IVA y Cry IVB son convertidas por proteólisis (dentro del intestino de la larva) en fragmentos tóxicos de 53 kDa (Chilcott y Ellar 1988) o de 68-78 kDa (Chunjatopornchai *et al.* 1988), tóxicos para *Anopheles* y *Culex*. El gen cry IVC, que parece ser una versión reducida de uno de los genes que especifican

para proteínas de 130 kDa (Thorne *et al.* 1986), codifica para una proteína de 78 kDa, que es un constituyente menor del cristal. El gen cry IVD codifica para una proteína de 72 kDa (que en la literatura suele ser mencionado como de 65 kDa), que es convertida por proteólisis en una toxina de 30-35 kDa, activa contra diversas líneas celulares de insectos (Chilcott y Ellar 1988). Por último, el gen cytA es distinto, desde el punto de vista estructural, a los otros genes, y su producto es citolítico para varias células, tanto de invertebrados como de vertebrados, incluyendo mamíferos. El producto de este gen, una proteína de 27 kDa, es la proteína más abundante en el cristal. Sin embargo, la forma procesada de 25 kDa, presenta una actividad mosquitocida menor que la esperada para una toxina primaria.

Las cuatro proteínas principales presentan actividad tóxica, pero ninguna es tan tóxica como el cristal entero. Así, se ha sugerido que existe sinergismo entre las proteínas del cristal, en particular entre las de 27 kDa y cada una de las otras proteínas tóxicas. De todos modos, el rol de la proteína Cyt A permanece incierto (Delecluse *et al.* 1991).

La existencia de los genes cryV y cryVI, codificando para proteínas activas contra nematodos, ha sido informada luego de la clasificación propuesta por Hofte y Whiteley (Feitelson *et al.* 1992). Sin embargo, esos genes no han sido aún caracterizados.

Por último, debe mencionarse que Crickmore y Ellar (1992) indican la posible existencia de una *chaperonina*, cuya función se relacionaría con la cristalización de las proteínas del cristal de *Bacillus thuringiensis*.

### 1.3.7. OTRAS TOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS*.

Seis toxinas distintas de la  $\delta$ -endotoxina han sido descritas como producidas por diversas cepas de *Bacillus thuringiensis* (Rowe y Margaritis 1987). Ellas son la  $\alpha$ -exotoxina (fosfolipasa C),  $\beta$ -exotoxina (exotoxina termolábil),  $\gamma$ -exotoxina (una enzima no identificada), la "toxina lábil", una toxina hidrosoluble, y el "factor ratón" (exotoxina). De ellas, solo la  $\alpha$ -exotoxina y la  $\beta$ -exotoxina son de relativo interés. La  $\alpha$ -exotoxina es una lecitinasa o fosfolipasa C, que es producida también por *Bacillus cereus*. Es termolábil, y se acumula durante el crecimiento exponencial. Es capaz de lisar distintos tipos de células. La  $\beta$ -exotoxina, o "factor mosca", es una

toxina termoestable, secretada por algunas variedades durante la fase exponencial de crecimiento, llegando a encontrarse en concentraciones de hasta 50 mg.l<sup>-1</sup> (Rogoff 1966). Es un derivado hidrosoluble de adenosina, cuyo efecto teratógeno se debe a su función de inhibidor de nucleotidasas. Presenta una muy elevada toxicidad para moscas (*Musca domestica*) y otros insectos, causando el bloqueo de la mitosis celular. Inhibe también la RNA-polimerasa DNA-dependiente en células bacterianas, y en mamíferos tiene propiedades mutagénicas. En células humanas provoca un marcado aumento de las aberraciones cromosómicas. Su uso como insecticida está prohibido en Europa y Estados Unidos de América, y las regulaciones sanitarias y agrícolas exigen que los productos basados en la  $\delta$ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* estén libres de su presencia por completo (Tompkins *et al.* 1990). En algunos países de Europa Oriental (Rusia, República Checa, Polonia) se producen y utilizan insecticidas basados en  $\beta$ -exotoxina, dirigidos casi con exclusividad al control de moscas en criaderos de animales. No se conocen cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* que sinteticen este compuesto (Nickerson 1980).

#### 1.4. *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *ISRAELENSIS* COMO AGENTE DE CONTROL DE VECTORES.

Antes de 1977, ciertas cepas de *Bacillus thuringiensis* patogénicas para Lepidópteros, y que carecían de la exotoxina soluble  $\beta$ -exotoxina, fueron probadas con poco o ningún éxito contra larvas de mosquitos y moscas. En 1977, en Israel, Goldberg y Margalit aislaron una cepa de *Bacillus thuringiensis* de larvas de mosquito muertas halladas en charcas del desierto del Negev (Goldberg y Margalit 1977). Esta cepa fue caracterizada como perteneciente al serotipo H-14 y se la denominó *israelensis*. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* presenta elevada toxicidad contra larvas de Dípteros (mosquito) y de Simúlidos (mosca), mientras que es inactivo frente a larvas de Lepidópteros.

##### 1.4.1. LOS DIPTEROS COMO PLAGAS SANITARIA Y DOMESTICAS.

Los insectos hematófagos, tales como mosquitos y ciertas moscas pertenecientes al género *Simulium*, han sido plagas que afectan al hombre desde tiempos prehistóricos. Estos insectos son vectores de un sinnúmero de enfermedades

del hombre y de animales mediante la transmisión de virus, bacterias, protozoarios y nematodos patógenos (Priest 1992). Entre las enfermedades más importantes transmitidas por estos insectos se encuentran la malaria (transmitida por cerca de 50 especies de mosquitos del género *Anopheles*), dengue, encefalitis y fiebre amarilla (transmitidas por mosquitos del género *Aedes* y *Culex*), filariasis, incluyendo elefantiasis (transmitida por mosquitos del género *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*) y la ceguera de río u oncocerquiasis (transmitida por moscas del género *Simulium*). Todos estos vectores han desarrollado cierto grado de resistencia a los insecticidas químicos más potentes empleados con mayor frecuencia tales como DDT, los organofosforados, carbamatos, y el piretro (Rawlins 1989). La malaria ha sido el más grande causante de muertes de la humanidad, y en la actualidad se reporta una incidencia de más de 120 millones de casos por año, que conduce, sólo en África, a una mortalidad cercana a un millón de muertes, en su mayoría entre niños menores de cinco años. Esta enfermedad trae aparejadas enormes pérdidas económicas, que se evaluaron en 800 millones de dólares en 1987 y que alcanzarán los 1800 millones en 1995 (Cattani *et al.* 1993).

Si bien el 90% de los casos de malaria, fiebre amarilla, dengue y filariasis ocurren en los trópicos, debido a las condiciones climáticas y ambientales favorables para el desarrollo de los vectores, en climas templados los insectos hematófagos son también capaces de transmitir un número menor de enfermedades. Además son causantes de molestias que los hacen ser considerados como plagas domésticas. Las picaduras y mordeduras de estos insectos provocan efectos que van desde leves molestias hasta severa comezón, que puede llegar hasta infecciones secundarias en el caso de lesiones causadas por daños en la piel. Si bien casos extremos, como los que ocurren en Camerún, donde una persona puede sufrir hasta trescientas picaduras en una noche (Anónimo 1992), son excepcionales, las molestias que se registran en zonas con climas más moderados han provocado la implementación de planes de control de mosquitos, tal como ocurre en Gran Bretaña (Priest 1992), Islandia y Suecia (Landén *et al.* 1994), Alemania (Becker y Ludwig 1983), Estados Unidos (Lacey 1985), Brasil (Davidson 1992), Egipto (Abdel-Hameed *et al.* 1990), China, Rusia y otros países del ex-bloque soviético (Becker y Margalit 1993). En Argentina sólo han sido intentados esporádicos planes de control con bioinsecticidas.

#### 1.4.2. CONTROL MICROBIANO DE MOSQUITOS

Los insectos con un par de alas funcionales se ubican en el orden *Diptera*. Dentro de este grupo se encuentran diversos "taxa" cuyos miembros pueden alimentarse de modo intermitente de sangre de vertebrados, y que pueden dividirse en dos grupos. El grupo más "primitivo" comprende moscas cuyas hembras se alimentan de sangre para proveerse de los nutrientes esenciales para el desarrollo de los huevos. En este grupo se incluyen los mosquitos (Familia *Culicidae*), moscas negras (Familia *Simuliidae*) y algunos miembros de la Familia *Ceratopogonidae*. El grupo más evolucionado de los dípteros incluye miembros que se alimentan de sangre, entre los que se encuentra la mosca tse-tsé, donde tanto machos y hembras se alimentan de sangre de vertebrados, la cual no es esencial para el desarrollo de los huevos. Este grupo no se incluye en el presente tratamiento.

Las hembras del mosquito depositan sus huevos de modo individual (géneros *Aedes* y *Anopheles*) o en balsas (*Culex*), en zonas húmedas o inundables (*Aedes*) o sobre la superficie del agua (*Culex* y *Anopheles*). Las larvas eclosionan a partir de los huevos cuando las condiciones son favorables, y se alimentan de partículas diminutas tales como algas y detritos, las que son ingeridas por filtración. Antes de la pupación, las larvas pasan por cuatro estadios, que duran entre 7 y 10 días; el adulto emerge luego de 1 a 3 días, su cuerpo se endurece, las alas se expanden y el insecto es capaz de volar y aparearse (Machado-Allison 1980; 1981; 1982).

Como es evidente, para realizar el control de las poblaciones de estos insectos, es necesario el uso de productos que afecten a los estadios de vida más sensibles, o sea las etapas larvianas. El control químico no necesita ser realizado a nivel de larvas, aunque esto es preferible.

El dicloro difenil tricloroetano (DDT) fue el primer insecticida organoclorado usado como agente de control de pestes agrícolas y sanitarias, revolucionario por su efectividad y su amplio espectro insecticida. Sin embargo, su persistencia en el ambiente, así como su acumulación en las grasas animales, promovieron la prohibición de ser usado. Los organofosforados (paratión, malatión) son usados en el control de moscas y mosquitos, y, a pesar de su toxicidad hacia humanos, son degradados en el ambiente con facilidad originando productos inofensivos. Los carbamatos, en particular, son útiles para mosquitos adultos, y los piretroides sintéticos actúan tanto sobre larvas como sobre adultos. La principal deficiencia de estos productos es la resistencia que los insectos adquieren hacia

ellos, con una velocidad tal que ha provocado la inutilidad de muchos productos y la consecuente necesidad de generación de productos alternativos cada vez más potentes. Datos de toxicidad comparada entre *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y otros insecticidas usados en el control de mosquitos indican que *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* es 2000 veces menos tóxico que paratión, 200 veces menos tóxico que malatión y 20 veces menos tóxico que la aspirina (Anónimo 1987).

Los agentes microbianos de control no están exentos de los problemas de resistencia, y algunos reportes al respecto han sido publicados (McGaughey 1985; McGaughey y Beeman 1988; Tabashnik *et al.* 1990). La resistencia aumenta al aumentar la aplicación de *Bacillus thuringiensis*, pero en el momento actual su presencia en poblaciones naturales es escasa o nula.

Otros beneficios del control microbiano son: i) bajos costos de investigación y desarrollo (8% del estimado para un insecticida químico - cuyo costo es de cerca de 20 millones de dólares); ii) ensayos toxicológicos menos intensivos; iii) mayor selectividad hacia los insectos blanco; iv) bajo riesgo tóxico de aplicación; v) bajo impacto ambiental. Por el lado negativo, puede destacarse que el mercado de bioinsecticidas es pequeño, la velocidad de muerte es baja y la duración del control (la persistencia del insecticida en el ambiente) es limitada. Aún así, en los Estados Unidos el mercado de control de mosquitos asciende a 4 millones de dólares, dentro de un mercado de 99 millones para productos basados en *Bacillus thuringiensis*.

## 1.5. PRODUCCION Y USO COMERCIAL DE BIOINSECTICIDAS A BASE DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

La elevada efectividad de este microorganismo se ve reflejada en el explosivo crecimiento que ha mostrado la producción de productos basados en *Bacillus thuringiensis*. En la década de los años 20 se llevó a cabo un proyecto internacional, financiado por los Estados Unidos, para el control de *Ostrinia* en países de Europa. En 1938 se introduce en Francia el primer producto comercial (*Sporéine*). En la década de los años 50 se realizan grandes campañas de control de plagas agrícolas en la entonces Unión Soviética, Francia, Alemania y Checoslovaquia. En 1957 se patentó el primer bioinsecticida en Estados Unidos (*Thuricide*). Entre 1960 y 1963, ocho patentes fueron otorgadas en los Estados Unidos de América para la

producción de insecticidas basados en *Bacillus thuringiensis*. En 1967, en Estados Unidos, se comercializaban dos productos basados en *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus popilliae*. Este último debe ser producido sobre larvas muertas del escarabajo, pues el bacilo es incapaz de esporular fuera del insecto hospedador (hospedante). El de *Bacillus thuringiensis*, sin embargo, es producido en procesos fermentativos convencionales. Esto hace que estos microorganismos sean clasificados en patógenos obligados (*Bacillus popilliae*) y patógenos facultativos (*Bacillus thuringiensis*). Más cerca, a fines de la década del 70, el mercado alcanzaba los 50 millones de dólares (menos del 1% del mercado mundial de insecticidas). Datos de 1986 indican que 410 formulaciones de *Bacillus thuringiensis* y 6 formulaciones de *Bacillus lentimorbus* y *B. popilliae* habían sido aprobadas para su uso en los Estados Unidos de América. Es de destacar que, en 1990, el mercado de "insecticidas biológicos" en ese país abarcaba 110 millones de dólares, lo que representaba el 2.5% del mercado total de pesticidas. Se esperaba que esta proporción aumentara hasta alcanzar un mercado de 300 millones de dólares en 1999 (Gelernter y Schwab 1993). De estos productos, los más importantes son, sin dudas, aquellos basados en *Bacillus thuringiensis*, los que representan el 90 % del mercado total de insecticidas biológicos (2.3 millones de kilogramos en 1987); según estimaciones de 1991 las ventas de productos basados en este microorganismo se habían duplicado desde 1987, y se pronosticaba un aumento del 20 % por año (Commandeur y Komen 1992). El uso de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* para el control de vectores abarcaba el 20% de las ventas de insecticidas basados en *Bacillus thuringiensis*, y se emplea, de modo mayoritario, en Estados Unidos y Africa Occidental. En este último caso se emplea para el control de *Simulium damnosum*, vector del agente de la ceguera de río u oncocerquiasis. Desde el inicio del plan, el uso de productos basados en la variedad *israelensis* pasó de 8000 litros, en un país, en 1981, a 700 000 litros, en once países, en 1989. El segundo uso mayoritario se dirige al control de *Aedes* y *Culex*, mosquitos considerados plagas domésticas y sanitarias, en el valle del Alto Rin (Alemania) y en algunas ciudades de los Estados Unidos.

#### 1.5.1. DESTINO DE LOS ESPOROS Y CRISTALES LIBERADOS AL AMBIENTE.

Es necesario asegurar que la introducción de microorganismos al ambiente no genere una alteración en la población normal. Para ello debe estudiarse cuál es la

situación normal de *Bacillus thuringiensis* en el ecosistema. Dulmage y Aizawa (1982) sugirieron que el hábitat normal de *Bacillus thuringiensis* es el suelo, a pesar de que sólo en 1987 se desarrolló un método apto para seleccionar y aislar *Bacillus thuringiensis* de muestras de suelo (Travers *et al.* 1987). Mas tarde Martin y Travers (1989) realizaron una búsqueda de *Bacillus thuringiensis* en muestras de suelo de Africa, Asia, Europa, y Norte y Sud América. Los resultados indican que en casi todas las muestras podían encontrarse cepas de *Bacillus thuringiensis*, y que muchas de ellas, iguales a otras conocidas desde el punto de vista bioquímico, no presentaban toxicidad como aquellas descritas con anterioridad. Otro hallazgo notable fue que las muestras de suelo que presentaban insectos no mostraban un mayor número de *Bacillus thuringiensis* que otras, indicando que la interacción entre el bacilo y el insecto no es obligatoria. Así, el rol normal de *Bacillus thuringiensis* en el ambiente permanece como un enigma. La ubicuidad de este microorganismo en suelos hace que la hipótesis de Dulmage y Aizawa sea válida, pero la contradicción que permanece es que *Bacillus thuringiensis* no es tóxico para larvas de insecto que desarrollan en el suelo, pero si para larvas de insecto aéreas y/o acuáticas. Es decir que el microorganismo produce una toxina activa contra larvas que nunca estarán en contacto con ella, excepto de modo incidental. Es evidente que la toxina debe cumplir alguna otra función en el ciclo de vida del microbio que aun no ha sido elucidada.

Esta contradicción fue resuelta, al menos en parte, por Smith y Couche (1991), quienes propusieron que la infección de los insectos es un evento natural, y que *Bacillus thuringiensis* esta presente en el filoplano, donde puede ser ingerido por larvas que se alimentan de hojas, generando una especie de relación simbiótica o de comensalismo (con la planta proveyendo nutrientes a través de exudados foliares, y el microorganismo actuando como regulador de la existencia de fitófagos). Cualquiera sea el caso, la verdadera situación de *Bacillus thuringiensis* permanece bajo cierta oscuridad.

### 1.5.2. ROL EN EL AMBIENTE

Uno de los principales estimadores de riesgo en la liberación de microorganismos al medio es el modo en que aquellos interactúan con el ambiente y con las otras poblaciones presentes.

El ciclo de *Bacillus thuringiensis* consiste de dos etapas bien diferenciadas: división celular vegetativa y esporulación. El esporo presenta escasa o nula actividad metabólica, y es más resistente a condiciones ambientales adversas (falta de nutrientes, desecación, etcétera). La germinación, y la subsecuente división celular, ocurren como respuesta a cambios ambientales, en general asociados a aumentos en los niveles de nutrientes.

*Bacillus thuringiensis* persiste en el suelo bajo la forma esporulada, con limitada multiplicación de formas vegetativas (Petras y Cassida 1985), pero se desconocen los roles de las células y de los esporos en la persistencia y en la dispersión de *Bacillus thuringiensis* en el ambiente.

*Bacillus thuringiensis* puede ser aislado a partir de un gran número de fuentes: insectos, suelos, hojas, productos almacenados, entre otras, y puede asumirse que es una bacteria indígena de algunos ambientes.

Si bien ha sido aislado de insectos, no se han descrito epizootias en ambientes abiertos. Sí se han descrito enzootias, es decir presencia constante pero no en proporciones tales que se declare la infección en todos los individuos de la población. Uno de los casos de epizootias fue el que dio origen al descubrimiento de la variedad *israelensis*.

Los estudios dedicados a establecer cómo se ve afectado el número de esporos en suelo luego de la aplicación permiten determinar que, luego de veinticinco semanas, el recuento de esporos (como unidades formadoras de colonias) disminuye cerca de un orden de magnitud. La toxicidad, sin embargo, cae a 10 % de su valor inicial en 15 días, y llega a ser menor que el 1 % en veinticinco semanas. El recuento de células vegetativas cae un 90 % en 24 horas (West *et al.* 1985). Para mejorar la persistencia, el producto debe contener protectores contra luz ultravioleta (causante de inactivación de los esporos) y compuestos que mejoren la adherencia a las hojas. El caso de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* es aún más desalentador: la alta toxicidad contra mosquitos se ve afectada por la escasa persistencia en el ambiente acuático. Las características de alimentación de las larvas de mosquito hacen que las preparaciones deban presentar ciertas características de flotabilidad y reciclado. Esto se logra mediante el uso de formulaciones de liberación lenta u otras técnicas similares, acompañadas por

compuestos que sirven como filtros de luz ultravioleta (Lacey *et al.* 1984; Lacey e Inman 1985; Aly *et al.* 1987).

La aplicación de *Bacillus thuringiensis* a campo parece incrementarse a medida que se imponen prácticas más aceptables desde el punto de vista ecológico. La historia de *Bacillus thuringiensis* como agente de control tiene más de 50 años, y la seguridad de su uso está fuera de toda duda. Las cepas salvajes podrían ser reemplazadas por organismos recombinantes o modificados mediante técnicas de ingeniería genética, siempre que se establezcan las condiciones de seguridad.

### 1.5.3. FUNCION DE LA $\delta$ -ENDOTOXINA

Por último debe mencionarse alguna hipótesis acerca de la "necesidad" que tiene *Bacillus thuringiensis* de sintetizar la  $\delta$ -endotoxina. Es evidente que el gasto de energía y nutrientes que sufre el microorganismo para producir un cristal proteináceo, que alcanza casi el 30 % del peso de la célula, durante una etapa de limitación de nutrientes o de *stress* fisiológico elevado, debe conferirle alguna ventaja selectiva. Ellar (citado en Meadows 1993) argumenta que el cristal, liberado al medio junto con el espora al ocurrir la lisis celular, es inactivo a pH no alcalino, y, en apariencia, sin valor para el espora en esas condiciones. Al ser ingerido por la larva, el elevado pH del tracto intestinal no permite la germinación del espora, pero sí la disolución del cristal y su posterior activación por proteasas. La toxina causa la lisis de las células epiteliales del intestino de la larva, con el consecuente desbalance osmótico y disminución del pH. Así el espora (que permanece dentro del tracto alimentario del insecto debido a la parálisis intestinal causada por la intoxicación) encuentra condiciones óptimas para la germinación y posterior colonización. En el mismo sentido, Aronson (1993) concluye que la razón de ser del gasto de recursos de la célula debe ser permitirle a la célula acceder a un nicho ecológico único para la propagación, para aumentar las chances de intercambio genético o para el establecimiento de una relación de comensalismo en el filoplano, es decir la supervivencia post-exponencial de *Bacillus thuringiensis*.

## 1.6 OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

Ante este panorama, donde el conocimiento acerca de *Bacillus thuringiensis* parece ser completo, cabe preguntarse cuáles son los puntos en los que se debe profundizar para llegar a tener un conocimiento más acabado. La producción de *Bacillus thuringiensis*, realizada tanto en el laboratorio como a nivel industrial desde hace décadas, dista de estar optimizada. Variaciones en los medios de cultivo hacen que la reproducibilidad sea difícil de alcanzar (Rowe y Margaritis 1987; Dulmage *et al.* 1990; Priest 1992; Battacharya *et al.* 1993). Asimismo, son necesarios estudios nutricionales para complementar los estudios de desarrollo de procesos. Por último, el ensayo y la caracterización de nuevos sistemas de cultivo son necesarios para permitir la optimización de los procesos de producción de *Bacillus thuringiensis*. Estos objetivos son los que se han planteado para realizar el presente trabajo de Tesis.

---

## **2** **Caracterización de un medio de cultivo para *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis***

---

## 2.1. NUTRICION Y NUTRIENTES.

### 2.1.1. REQUERIMIENTOS DE CARBONO Y NITROGENO.

Los organismos heterótrofos obtienen el carbono que forma parte de las estructuras celulares a partir de compuestos orgánicos. La síntesis de material celular y las funciones celulares que deben ser cumplidas para mantener la viabilidad celular (funciones de mantenimiento), exigen que alguno de los sustratos presentes en el medio sea empleado como fuente de energía. Asimismo, los requerimientos nutricionales de un organismo pueden variar de modo cualitativo o cuantitativo, según las condiciones (temperatura, pH, osmolaridad, etcétera) en las que el microorganismo está siendo cultivado (Aiba *et al.* 1973; Bailey y Ollis 1986).

La célula requiere, asimismo, algún aceptor de los electrones originados por el metabolismo; el oxígeno es uno de los aceptores de electrones más comunes en el metabolismo energético, y, en su ausencia, algunas bacterias son capaces de emplear algunos iones (sulfato, nitrato) como aceptores finales de electrones.

Además de los nutrientes necesarios para crecimiento y para energía, hay otros que deben ser considerados cuando se intenta el cultivo de un microorganismo. Los elementos que están en mayor proporción en la célula (C, H, O, N) deben estar acompañados por otros minoritarios (P, S, K, Mg), por elementos "traza" y por vitaminas, hormonas y otros factores.

Suele definirse como "factor de crecimiento" a aquellos compuestos orgánicos esenciales que se incorporan enteros a la estructura celular, tal como es el caso de algunos aminoácidos. Esta definición excluye a compuestos que son catabolizados, como por ejemplo las fuentes de carbono y energía.

Es posible obtener todos los nutrientes necesarios para un cultivo microbiano si se usan medios de cultivo compuestos por extractos o hidrolizados de tejidos vegetales y/o animales (extractos de macerados de maíz, harinas vegetales y/o animales, hidrolizados pépticos, sueros, entre otros productos). Estos medios son ricos en todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de un microorganismo,

pero presentan la desventaja de poseer una composición no definida y variable; se denominan "medios complejos".

### 2.1.2. MEDIOS DEFINIDOS.

Para poder estudiar ciertas características de los microorganismos suelen necesitarse medios de composición química definida o "sintéticos", en los que es posible conocer con certeza la composición. En general (Pirt 1975), se define un medio mínimo como aquel que contiene sólo los nutrientes esenciales para el crecimiento de un microorganismo, y un medio rico como aquel en el cual los nutrientes esenciales se suplementan con otros que actúan como fuentes alternativas de los elementos, bajo la forma de aminoácidos, vitaminas y/o precursores de aminoácidos u otros intermediarios de la síntesis celular.

### 2.1.3. MACRONUTRIENTES.

Los ocho macronutrientes (C, H, N, O, S, P, Mg, K) son requeridos en concentraciones elevadas (Tabla 2.1). Estos elementos son constituyentes del material orgánico (proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas, etcétera). Los cuatro primeros constituyen entre el 90 y el 95 % del peso seco de la célula (Dunn 1985).

El carbono está en una proporción cercana al 50 % del peso seco de una bacteria, y todos los componentes carbonados sintetizados por una célula son biodegradables. Dentro de los compuestos carbonados, los carbohidratos, y en particular la glucosa, son de elección como fuentes de carbono y energía.

El nitrógeno comprende entre el 10 y el 12 % del peso seco de una bacteria, y los requerimientos de este macronutriente pueden ser satisfechos por un vasto conjunto de compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos. Casi todos los microorganismos pueden emplear amonio como fuente de nitrógeno, reflejando el rol central del  $\text{NH}_3$  en el metabolismo de aquel elemento. Además, en ausencia de oxígeno, algunas bacterias pueden emplear nitrato como último aceptor de electrones de la cadena respiratoria.

**Tabla 2.1.** Macronutrientes: Función fisiológica y concentraciones en los medios de cultivo.

| Elemento | Función fisiológica                                      | Concentración*      |
|----------|--|---------------------|
| C        | Constituyente del material celular.<br>Fuente de energía | $\geq 10^{-2}$      |
| N        | Constituyente de proteínas, ácidos nucleicos y coenzimas | $10^{-3}$           |
| H        | Material celular, agua                                   | --                  |
| O        | Material celular, agua, respiración                      | --                  |
| S        | Proteínas y coenzimas                                    | $10^{-4}$           |
| P        | Ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos              | $10^{-4} - 10^{-3}$ |
| K        | Principal catión inorgánico.<br>Cofactor                 | $10^{-4} - 10^{-3}$ |
| Mg       | Cofactor. Presente en pared celular y membranas.         | $10^{-4} - 10^{-3}$ |

\*mol.l<sup>-1</sup>.

En muchos casos los aminoácidos son fuentes de nitrógeno adecuadas y relevan a la célula de ciertas actividades biosintéticas, incrementando así el rendimiento celular. Existe un gran número de otros compuestos nitrogenados (polipéptidos, proteínas) que pueden ser utilizados por los microorganismos, siempre que estos sean capaces de degradarlos para originar unidades más pequeñas, tales como aminoácidos y amonio.

El hidrógeno y el oxígeno están presentes en todos los compuestos orgánicos que existen en la célula. Estos dos elementos provienen, en general, de las fuentes de carbono, excepto cuando el crecimiento se realiza a expensas de sustratos muy reducidos (tales como hidrocarburos). En el metabolismo aeróbico, el oxígeno es empleado como aceptor final de electrones. Debido a su baja solubilidad en medio acuoso, este gas debe ser suministrado a los medios bajo la forma molecular de forma ininterrumpida.

Las fuentes habituales de fósforo son los fosfatos. En general estas sales son empleadas como *buffers*, por lo que, en los medios de cultivo, suelen estar presentes en exceso. Los requerimientos de azufre suelen cubrirse mediante el agregado de sulfatos. El sulfato de amonio es empleado como fuente de nitrógeno y de sulfato en la mayoría de los medios de cultivo.

El potasio es el principal catión inorgánico de la célula. Además de ser requerido como cofactor de enzimas, presenta un papel crucial en la síntesis de proteínas, en el metabolismo de carbohidratos y en procesos de transporte a través de membranas. El magnesio, importante cofactor de enzimas, está presente también en la pared celular y en membranas, y es requerido para la actividad ribosómica.

#### 2.1.4. FACTORES DE CRECIMIENTO.

Algunos microorganismos son incapaces de sintetizar todos los componentes celulares a partir de compuestos más sencillos, por lo que se impone el suministro externo de ciertas moléculas orgánicas preformadas, conocidas con el nombre de "factores de crecimiento". Estos compuestos estimulan el crecimiento de todos los microorganismos, y algunos de ellos tienen un requerimiento absoluto.

Las vitaminas son componentes (o precursores) de coenzimas o grupos prostéticos. Las vitaminas requeridas por la mayoría de los microorganismos suelen ser ácido *p*-aminobenzoico, tiamina (vitamina B1), riboflavina (B2), ácido nicotínico (B3), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6) cianocobalamina (B12), biotina, ácido fólico, ácido lipoico, inositol, vitamina K, ácido mevalónico y hemina, todas ellas en concentraciones que van entre  $10^{-12}$  y  $10^{-6}$  mol.l<sup>-1</sup>.

Aunque, como se dijo antes, pueden emplearse como fuentes de carbono y energía, los aminoácidos son, en general, componentes estructurales, y sus requerimientos se satisfacen con concentraciones que se encuentran en el orden de  $10^{-6}$  a  $10^{-3}$  mol.l<sup>-1</sup>.

Algunos microorganismos suelen tener requerimientos hacia otro tipo de factores, tales como ácidos grasos (ácido oleico) o precursores de la síntesis de los mismos (EDTA).

## 2.2. EL CASO DE *BACILLUS*.

Los miembros del género *Bacillus* pueden, en general, ser cultivados en medios sintéticos (Demain 1958; Singer *et al.* 1966; Dawes y Thornley 1970; Singh 1971). Como es lógico, los medios empleados en estudios nutricionales o metabólicos son muy distintos a aquellos usados en desarrollo de procesos y en producción. Estos últimos deben ser económicos y los microorganismos suelen presentar en ellos un crecimiento más profuso (debido a que, como se dijo antes, los rendimientos son mayores en medios complejos). Los medios industriales se basan en el uso de materiales naturales, conservando un adecuado balance de carbohidratos, compuestos nitrogenados y sales minerales (Priest y Sharpe 1989). Pero cuando se intenta cultivar un microorganismo con el fin de realizar estudios acerca de su fisiología, es necesario contar con medios sencillos, que no enmascaren limitaciones, o que no contengan inhibidores o estimulantes del crecimiento (Pirt 1975).

El conocimiento del rol de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre el crecimiento de *Bacillus megaterium* fue estudiado por Singh (1971), encontrando que variaciones en las relaciones de concentración de fuentes de carbono y de nitrógeno provocan variaciones en los recuentos de esporos y de células viables alcanzados.

También existen casos de microorganismos, patógenos para ciertos insectos, que son muy fastidiosos en su crecimiento. El caso paradigmático podría ser el de *Bacillus larvae*, patógeno para larvas de abejas, que requiere extractos de polen o de larvas de abeja para su crecimiento.

### 2.2.1. *BACILLUS THURINGIENSIS*.

El uso de medios definidos para cultivar *Bacillus thuringiensis* fue intentado por Singer *et al.* (1966), quienes estudiaron medios definidos para tres bacilos patógenos para insectos, capaces de crecer como saprófitos en medios complejos: *Bacillus popilliae* (patógeno para *Popillia japonica*, plaga agrícola causante de importantes daños), *Bacillus sphaericus* (único patógeno para mosquitos conocido en aquel momento) y *Bacillus thuringiensis*.

*Bacillus popilliae* crece en medios sintéticos pero con requerimiento estricto de vitaminas. Aún así el crecimiento es pobre comparado con el observado en medios con extracto de levadura. El caso de *Bacillus sphaericus* difiere del anterior, debido a la incapacidad del microorganismo para utilizar azúcares, polisacáridos y otros carbohidratos como fuentes de carbono. Sin embargo, *Bacillus sphaericus* es capaz de emplear acetato, piruvato o intermediarios del ciclo de Krebs, cuando son suplementados con aminoácidos. Inclusive los aminoácidos arginina, prolina y glutamina pueden ser usados como única fuente de carbono y nitrógeno.

*Bacillus thuringiensis* muestra un comportamiento distinto: cuando es cultivado en medios con glucosa sin el agregado de fuentes de nitrógeno complejas, el crecimiento se observa a tiempos de cultivo mayores de 96 horas. Este retraso puede reducirse con el agregado de hidrolizado de caseína o de una mezcla de aminoácidos. Sin embargo, la esporulación es pobre. No se obtiene un medio de cultivo sintético satisfactorio.

Trabajos posteriores (Singer y Rogoff 1968) demuestran que, en medios sintéticos, el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* es inhibido por algunos aminoácidos, en especial los del grupo de la valina. Estos resultados se complementan con los de Rajalakshmi y Shethna (1977, 1980), quienes estudiaron el efecto de cisteína y cistina, entre otros aminoácidos. Los medios con glucosa y sales fueron suplementados con diversos aminoácidos y vitaminas. Leucina, isoleucina, serina, lisina, histidina, tirosina, treonina y valina no promueven el desarrollo de *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*, mientras que sí lo hacen glutamina, glicina, prolina y metionina, aunque con fases de retardo de más de 80 horas de duración. Con estos últimos puede observarse esporulación. Cisteína también soporta crecimiento, con una fase de retardo de menor duración (10 horas). Sin embargo, concentraciones de cistina mayores que 0.15 % suprimen la formación del cristal, y concentraciones mayores que 0.25 % suprimen tanto la esporulación como la formación del cristal.

Nickerson y Bulla (1974) analizaron la fisiología de 18 cepas de *Bacillus thuringiensis*, y los requerimientos nutricionales mínimos para crecimiento, esporulación y formación del cristal. *Bacillus thuringiensis* no crece en medios con glucosa y sales. Sin embargo, todas las cepas ensayadas crecen y esporulan cuando el medio se suplementa con ácido glutámico, ácido aspártico o ácido cítrico (o sus sales) en concentraciones de alrededor de 2 g.l<sup>-1</sup>, mayores que las requeridas para suplir requerimientos auxotróficos de aminoácidos. Los bacilos esporulados requieren grandes concentraciones de glutamato (*Bacillus cereus* crece en un medio

definido con 1.84 g.l<sup>-1</sup> de glutamato, pero requiere cerca de 10 g.l<sup>-1</sup> para esporular). También requieren la presencia de aspartato o alanina y sulfato de amonio (Nakata 1964; Buono *et al.* 1966).

Otra observación de Nickerson y Bulla (1974) fue que ninguna de estas cepas era capaz de crecer en fumarato, succinato u oxalacetato. Tampoco hubo crecimiento si las concentraciones de aspartato, glutamato o citrato eran menores que 0.4 mM; en estos casos se encontraron células deformadas y esporulación aberrante.

Citrato es capaz de promover crecimiento en concentraciones menores que los aminoácidos, y pareciera ser el componente esencial para el crecimiento. Aspartato y glutamato permitirían el crecimiento por poder ser convertidos en citrato, lo cual no ocurriría en el caso de, por ejemplo, succinato. En su informe, Nickerson y Bulla distinguen entre esporos estables y esporos que no son capaces de germinar rápido y que sufren lisis prematura. Asimismo, indican que no es posible obtener esporos estables con estos medios, y que debe emplearse casaminoácidos (un hidrolizado ácido de caseína, donde todo el nitrógeno se encuentra en aminoácidos u otros compuestos nitrogenados sencillos) para promover la rápida germinación de los esporos.

Este trabajo de Nickerson y Bulla presenta una gran desventaja: los resultados referidos a crecimiento son informados de modo cualitativo, por lo que es muy difícil una comparación con otros resultados. El factor subjetivo de las determinaciones (“growth +” o “growth ++”) no permite una discusión bien fundamentada.

Trabajos posteriores (Nickerson y Bulla 1975) relacionados con el metabolismo de lípidos en *Bacillus thuringiensis* permitieron sugerir que, para crecer en medios definidos, este microorganismo requiere un estimulador de la síntesis de ácidos grasos, tal como EDTA, citratos, etcétera. Estos trabajos fueron los últimos publicados en relación con cultivos de *Bacillus thuringiensis* en medios sintéticos.

En base a estos antecedentes bibliográficos, y consciente de las desventajas que presentan los medios complejos para estudios de cultivos de microorganismos, se intentó el reemplazo (total o parcial) de la fuente de nitrógeno compleja (extracto de levadura) por alguna fuente de nitrógeno simple (aminoácidos).

## 2.3. MATERIALES Y METODOS

2.3.1. MICROORGANISMO. El microorganismo empleado en este estudio fue la cepa 1882 de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, serotipo H-14, cuyo origen es la colección de *l'Institut Pasteur*, París, Francia. El microorganismo es mantenido en forma esporulada en agar nutritivo, bajo vaselina, a 4 °C. Los subcultivos se preparan en agar nutritivo inclinado, sembrando con ansa sobre la superficie e incubando durante 96 h a 30 °C, con el fin de asegurar esporulación total. Los tubos se conservan refrigerados (4 °C) hasta su empleo.

2.3.2. INOCULOS. Los inóculos se prepararon resuspendiendo, con agua destilada estéril, el desarrollo de los tubos de agar, y sembrando 2 ml de la suspensión en frascos erlenmeyer, de un litro de capacidad, conteniendo 100 ml de medio de cultivo estéril. Para asegurar la total ausencia de células vegetativas en los medios, las suspensiones de esporos fueron sometidas a un tratamiento térmico (incubación a 60 °C durante 20 minutos) con el fin de eliminar todas las formas vegetativas que pudieran estar presentes. La suspensión tratada fue centrifugada (10000 rpm, 10 min), y el paquete celular fue lavado tres veces con agua destilada estéril, con el fin de eliminar la totalidad de los restos celulares y cualquier otro material soluble que pudiera haber permanecido y cuya presencia podría enmascarar los resultados.

2.3.3. MEDIO DE CULTIVO. El medio basal empleado tuvo la siguiente composición (g.l<sup>-1</sup>): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.05; CaCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.08; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.005; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.005; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.0005; KPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>, 1.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5. El pH fue ajustado a 6.8 luego de la esterilización. Este medio fue suplementado con diversas fuentes de carbono y nitrógeno, así como con factores de crecimiento, sales y micronutrientes, tal como se describe en la sección Resultados y Discusión. La esterilización de los medios (121 °C, durante 15 min) fue realizada con los componentes del medio por separado, para evitar interacciones no deseadas. Las vitaminas fueron esterilizadas por filtración a través de membranas de 0.22 μm de diámetro de poro. El medio testigo (GYS) estuvo compuesto por (g.l<sup>-1</sup>): glucosa, 7; extracto de levadura, 1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1; KPO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>, 1.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.05; CaCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.08.

2.3.4. CONDICIONES DE CULTIVO. Los erlenmeyeres fueron incubados en agitadores rotatorios climatizados, a 30 °C, y con una velocidad de agitación de 200 revoluciones por minuto.

### 2.3.5. DETERMINACIONES ANALITICAS.

2.3.5.1. BIOMASA. El crecimiento del microorganismo fue seguido por los siguientes parámetros:

- Determinación de la densidad óptica de los cultivos a 625 nm.
- Recuentos en cámara de Petroff-Hauser.
- Determinación del peso seco: un volumen conocido de muestra se centrifuga a 10000 rpm, durante 15 min. El paquete celular se lava dos veces con agua destilada para eliminar componentes solubles y se centrifuga. El paquete celular final se resuspende y se lleva a estufa a 105 °C, en recipiente tarado, hasta peso constante.

2.3.5.2. RECUESTO DE ESPOROS. El recuento de esporos fue realizado por diluciones seriadas en placas de agar nutritivo. Debido a la movilidad de los bacilos, es necesario realizar una siembra en profundidad para evitar la diseminación de las colonias sobre la superficie del agar. Diluciones 1:10 de las muestras de cultivo se inactivan por tratamiento térmico (20 min a 60 °C) para eliminar las formas vegetativas. Esta muestra inactivada se somete a ultrasonido para romper los agregados que puedan haberse formado entre los esporos y los cristales. Las diluciones se realizan en solución fisiológica estéril, y se siembra 1 ml de la dilución apropiada en el centro de una placa de Petri estéril. Sobre la muestra se vierten 10 - 12 ml de agar nutritivo estéril fundido ( $T \cong 60$  °C) y se imprime a la caja un movimiento circular (20 giros en sentido horario y 20 giros en sentido antihorario), con el fin de obtener una buena distribución de los esporos en el agar. Se incuba a 30 °C durante 24 h, y se determina el número de colonias aparecidas.

2.3.5.3. GLUCOSA. La determinación de la concentración de glucosa fue realizada mediante la reacción con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), según la técnica descrita por Miller (1959).

2.3.5.4. NITROGENO TOTAL. La determinación del nitrógeno total en las muestras fue realizada mediante el método de Kjeldahl. Las muestras líquidas (sobrenadantes de cultivo o muestras enteras) se llevan a sequedad, previa acidificación con  $H_2SO_4$  (2 M). El residuo seco se digiere con  $H_2SO_4$  concentrado en presencia de un catalizador (HgO). El  $NH_3$  formado se cuantifica por titulación,

usando, en este caso, un analizador automático de nitrógeno (Tecator Kjeltex Auto 1030).

2.3.5.5. DETERMINACION DE AMONIO. La concentración de amonio en el medio de cultivo fue determinada por la reacción de formación de azul de indofenol, que es proporcional a la concentración de amonio presente en el medio. La absorbancia de la mezcla de reacción se lee en espectrofotómetro a 540 nm.

2.3.5.6.  $\delta$ -ENDOTOXINA. La concentración de  $\delta$ -endotoxina fue determinada por solubilización selectiva de los cristales obtenidos al final de cada cultivo, cuando la lisis ha sido completada. Un volumen conocido de cultivo se centrifuga a 10000 rpm durante 15 min. El paquete celular se lava con una solución NaCl 1M - Tritón X-100 (0.002%), para eliminar las proteasas adsorbidas al cristal. Se centrifuga y se enjuaga tres veces con agua destilada para eliminar sales solubles. El paquete celular se resuspende en NaOH 0.1 M, y se incuba 1 h a 37 °C, controlando, por observación microscópica, la total ausencia de cristales. Se centrifuga (15000 rpm, 15 min), y se determina la concentración de proteínas en el sobrenadante, según el método de Lowry *et al.* (1951).

## 2.4. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 2.4.1. FUENTES DE NITROGENO, FACTORES DE CRECIMIENTO Y OTROS NUTRIENTES.

Tal como fuera mencionado en la introducción al capítulo, los datos informados en la literatura acerca del cultivo de *Bacillus thuringiensis* en medios sintéticos son escasos. El trabajo antecedente más exhaustivo es el de Nickerson y Bulla (1974) en el cual se informan resultados obtenidos con dieciocho cepas distintas de *Bacillus thuringiensis*, entre las cuales no se encuentra la variedad *israelensis* debido a no haber sido descrita hasta ese momento. Si bien desde el punto de vista microbiológico no hay grandes diferencias entre las distintas variedades de *Bacillus thuringiensis* (Smith 1982), cuando la variedad *israelensis* es cultivada en medios de distinta composición, es posible encontrar diferencias tanto en los rendimientos celulares como en la composición de la  $\delta$ -endotoxina, (Smith 1982; Faloci *et al.* 1990).

Los ensayos realizados tuvieron como base el medio descrito por Nickerson y Bulla (1974), por haber demostrado ser un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de otras variedades de *Bacillus thuringiensis*. Una serie de experimentos exploratorios permitió determinar que es necesario someter a los esporos empleados como inóculo a un proceso de lavado, con el fin de eliminar los restos de medio de cultivo que pudieran ser acarreados al transferir el material desde el medio sólido al medio líquido. Por lo tanto, salvo aclaración en contrario, en todos los experimentos que se discuten se empleó esta estrategia de siembra.

La primera serie de ensayos se realizó sembrando esporos en medios donde el extracto de levadura fue reemplazado por glutamato y amonio, o por citrato y amonio (Tabla 2.2).

Los resultados obtenidos (Tabla 2.3) indican que el crecimiento observado fue escaso o nulo; en los medios con glucosa, glutamato y amonio (M1), y con glucosa, citrato y amonio (M2) se observó algún desarrollo luego de 72 horas de incubación. En el medio GYS el desarrollo es completo luego de 48 horas de cultivo. Estos resultados indican que el extracto de levadura aporta no sólo compuestos utilizables como fuente de nitrógeno sino también algunos factores (vitaminas, micronutrientes) esenciales para el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

**Tabla 2.2.** Composición de los medios empleados en el ensayo de empleo de fuentes de nitrógeno sencillas.

| Medio | Glucosa<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | Glutamato*<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | Citrato*<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>(g.l <sup>-1</sup> ) | EL<br>(g.l <sup>-1</sup> ) |
|-------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|---|----------------------------|
| 1     | 3.50                            | 3.95                               | --                               | 0.20  | --                         |
| 2     | 3.50                            | 3.95                               | --                               | --  | --                         |
| 3     | 3.50                            | --                                 | 4.10                             | 0.20  | --                         |
| 4     | 7.00                            | --                                 | --                               | 0.20  | --                         |
| 5     | --                              | 7.90                               | --                               | --  | --                         |
| 6     | --                              | 7.90                               | -                                | 0.20  | --                         |
| 7     | --                              | 3.95                               | 4.10                             | --  | --                         |
| 8     | --                              | --                                 | 8.20                             | 0.20  | --                         |
| GYS   | 7.00                            | --                                 | --                               | 1.00  | 1.0                        |

\*Sales sódicas.

El resto de los componentes de los medios se detalla en Materiales y Métodos. Sección 2.3.3.

**Tabla 2.3.** Resultados de los ensayos de recambio de fuentes de nitrógeno complejas, empleando los Medios descritos en Tabla 2.2.

| Medio | Densidad óptica (625 nm) |      |      |       |
|-------|--------------------------|------|------|-------|
|       | 0 h                      | 48 h | 72 h | 120 h |
| 1     | 0.10                     | 0.88 | 1.26 | 2.40* |
| 2     | 0.11                     | 0.43 | 0.67 | 0.94  |
| 3     | 0.10                     | 0.20 | 0.34 | 1.12  |
| 4     | 0.09                     | 0.09 | 0.09 | 0.09  |
| 5     | 0.09                     | 0.19 | 0.28 | 0.28  |
| 6     | 0.11                     | 0.23 | 0.42 | 0.48  |
| 7     | 0.10                     | 0.39 | 0.63 | 0.96  |
| 8     | 0.09                     | 0.13 | 0.30 | 1.02  |
| GYS   | 0.10                     | 6.70 | 6.50 | 5.90  |

\*Se observan cadenas de bacilos esporulados, sin cristales.

Si estos resultados se comparan con los resultados obtenidos en medios complejos se observa que las diferencias en las concentraciones de biomasa obtenidas son muy marcadas; en el medio testigo (GYS) la concentración de biomasa máxima es cercana a  $3.5 \text{ g.l}^{-1}$ , y la concentración final es de alrededor de  $1.5 \text{ g.l}^{-1}$  (que corresponde a una densidad óptica de alrededor de 7 unidades). Igual situación indican Demain (1958), Nickerson y Bulla (1974) y Rajalakshmi y Shethna (1977; 1980). Estos autores resuelven el problema suplementando los medios con vitaminas, precursores y micronutrientes, que, en medios complejos, son aportadas por, entre otros componentes, extracto de levadura, peptonas, harinas e hidrolizados varios (Bridson y Brecker 1970). Por lo tanto, la siguiente serie de ensayos fue realizada para determinar la posibilidad del reemplazo de extracto de levadura por una fuente de nitrógeno sencilla suplementada con vitaminas y sales. Se estableció un tiempo de cultivo máximo de 48 horas.

Dado que la composición del extracto de levadura es, dentro de ciertos límites, conocida, es posible pensar que un reemplazo de esta fuente compleja por soluciones de vitaminas, micronutrientes y sales permitirá obtener un medio simple y definido (Pirt 1975). Es decir que los resultados de los ensayos con los medios con glutamato y citrato podrían revertirse mediante el agregado de las vitaminas y micronutrientes presentes en el extracto de levadura.

Las concentraciones empleadas en estos ensayos fueron equivalentes a las que están presentes en el medio testigo, con  $1 \text{ g.l}^{-1}$  de extracto de levadura (Tabla 2.4), que es utilizado como testigo. Los Medios MS y MSV fueron suplementados con glutamato ( $1.5 \text{ g.l}^{-1}$ ).

Los resultados obtenidos; que se presentan en la Tabla 2.5, permiten ver que en ninguno de los medios ensayados hubo desarrollo apreciable. Esto indica con claridad que no es posible reemplazar el extracto de levadura por las soluciones ensayadas (aminoácidos o aminoácidos / sales / vitaminas).

**Tabla 2.4.** Composición de los medios de cultivo empleados en los experimentos de recambio de extracto de levadura por micronutrientes, sales y vitaminas.

| Componente  | Testigo<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | MS<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | MSV<br>(g.l <sup>-1</sup> ) |
|---|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Glucosa   | 7.00                            | 7.00                       | 7.00                        |
| Extracto de levadura                                | 1.00                            | --                         | --                          |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | 1.00                            | 1.00                       | 1.00                        |
| Glutamato   | --                              | 1.50                       | 1.50                        |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0.08                            | 0.08                       | 0.08                        |
| MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O                 | 0.05                            | 0.05                       | 0.05                        |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0.50                            | 0.50                       | 0.50                        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 1.50                            | 1.50                       | 1.50                        |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | 1.50                            | 1.50                       | 1.50                        |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | --                              | 0.01                       | 0.01                        |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                | --                              | 0.0075                     | 0.0075                      |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | --                              | 0.05                       | 0.05                        |
| BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>                      | --                              | 0.05                       | 0.05                        |
| MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | --                              | 0.005                      | 0.005                       |
| EDTA  | --                              | 0.15                       | 0.15                        |
| Vitaminas   | --                              | --                         | *                           |

\*MSV contiene vitaminas en las siguientes concentraciones (μg.l<sup>-1</sup>): tiamina, 30; riboflavina, 85; ácido nicotínico, 780; ácido pantoténico, 60; piridoxina, 30; ácido fólico, 7.5; inositol, 1350; biotina, 0.75. La concentración de EDTA es la recomendada por Nickerson y Bulla (1975).

**Tabla 2.5.** Resultados obtenidos en los medios descritos en Tabla 2.4.

| Medio   | Densidad óptica (625 nm) |      |      |      |
|---------|--------------------------|------|------|------|
|         | 0 h                      | 12 h | 24 h | 48 h |
| Testigo | 0.08                     | 1.90 | 4.40 | 6.60 |
| MS      | 0.06                     | 0.08 | 0.14 | 0.14 |
| MSV     | 0.07                     | 0.12 | 0.12 | 0.13 |

Pero podría ocurrir que los factores fueran requeridos para la germinación de los esporos y no para el crecimiento de células vegetativas. Por lo tanto se realizó un ensayo donde el inóculo fue preparado con suspensiones de células vegetativas. Estas fueron obtenidas mediante la inoculación de suspensiones de esporos en medios complejos; cuando, por observación microscópica, se detectaron células vegetativas en fase exponencial de crecimiento (alrededor de 5 horas de cultivo), se realizó la cosecha.<sup>1</sup> El medio se centrifuga, y el paquete celular se lava tres veces con agua destilada estéril. Por último, el paquete celular, resuspendido en agua destilada estéril, se emplea para inocular los medios a ensayar. Estos tuvieron la composición que se presenta en Tabla 2.6.

<sup>1</sup>En esta fase de crecimiento las células son móviles y no presentan presporos ni gránulos de material de reserva, los cuales se ven opacos y oscuros al microscopio de contraste de fase.

**Tabla 2.6.** Medios empleados en los ensayos de requerimientos nutricionales de células vegetativas.

| Medio | Glucosa<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | E.L.<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | Glutamato*<br>(g.l <sup>-1</sup> ) | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>(g.l <sup>-1</sup> ) |
|-------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------------|---|
| 1     | 7.0                             | 1.0                          | 1.6                                | 0.47  |
| 2     | 7.0                             | --                           | --                                 | 1.88  |
| 3     | 7.0                             | --                           | 2.5                                | 0.47  |
| 4     | 7.0                             | 3.0                          | --                                 | 0.47  |

La concentración de N total en los medios fue de 0.3 g.l<sup>-1</sup>.

\*Sal sódica.

Debe observarse (Tabla 2.7) que en los medios 1 y 4 (ambos con extracto de levadura) el desarrollo fue rápido, llegando a obtenerse crecimiento máximo a tiempos cercanos a las 24 horas de cultivo. El reemplazo parcial de extracto de levadura por glutamato no afecta de modo significativo la concentración de biomasa alcanzada, aunque ésta es mayor en medios con mayor concentración de extracto de levadura. Este fenómeno podría deberse al consumo de restos carbonados presentes en el extracto de levadura.

**Tabla 2.7.** Resultados de los ensayos de cultivos de células vegetativas.

| Medio | Densidad óptica (625 nm) |      |      |      |      |      |      |      | PS   |
|-------|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|       | 0 h                      | 2 h  | 4 h  | 6 h  | 8 h  | 10 h | 24 h | 48 h |      |
| 1     | 0.12                     | 1.40 | 2.00 | 2.55 | 3.90 | 4.60 | 6.40 | 8.25 | 1.05 |
| 2     | 0.15                     | 0.16 | 0.17 | 0.25 | 0.25 | 0.35 | 0.53 | 0.55 | 0.24 |
| 3     | 0.12                     | 0.14 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.27 | 0.74 | 2.10 | 0.40 |
| 4     | 0.15                     | 0.90 | 3.55 | 4.00 | 4.60 | 5.30 | 7.90 | 9.80 | 1.45 |

PS: peso seco (g.l<sup>-1</sup>) a 48 horas de cultivo

Otra vez los medios donde el extracto de levadura fue reemplazado por glutamato y sulfato de amonio no promovieron desarrollo apreciable (Tabla 2.7), con lo que se puede afirmar que el requerimiento de este componente es tanto para la germinación de esporos como para el desarrollo de células vegetativas. Todos los experimentos hasta aquí detallados indican la imposibilidad del reemplazo de la fuente de nitrógeno compleja por aminoácidos, solos o en combinación con sales y vitaminas. Por otro lado, la presencia de extracto de levadura en los medios hace innecesario el agregado de sales y vitaminas a los medios.

#### 2.4.2. INFLUENCIA DE LA RELACION ENTRE LA FUENTE DE CARBONO Y LA FUENTE DE NITROGENO.

Es conocida la importancia de la relación entre el carbono y el nitrógeno en el crecimiento de distintos microorganismos (Roos *et al.* 1985), como así también el efecto de la relación entre las fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico (Welsh *et al.* 1987). Para que el medio de cultivo tenga una composición tal que sea glucosa el sustrato limitante del crecimiento, se realizaron ensayos donde se intentó encontrar una relación carbono : nitrógeno adecuada. Debido a que el medio contiene glucosa (fuente de carbono), extracto de levadura (fuente de nitrógeno orgánica) y sulfato de amonio (fuente de nitrógeno inorgánica), se realizó el estudio de los efectos de la variación en la relación entre los dos tipos de fuente de nitrógeno.

Los experimentos fueron diseñados variando la relación carbono/nitrógeno, mediante el empleo de distintas concentraciones de las fuentes de nitrógeno y de carbono según se observa en las Tablas 2.8a y 2.8b. En ellos se ensayaron medios de cultivo donde la concentración de uno de los componentes se mantuvo constante, estudiando el efecto de la variación de la concentración del otro componente en estudio. La fuente de carbono estudiada fue glucosa, y la de nitrógeno fue extracto de levadura, suplementada o no con sulfato de amonio, según se describe en las Tablas. El resto de los componentes (fosfatos, sales) se aumentó de modo proporcional al aumento de los componentes en estudio. Los cultivos fueron evaluados según el máximo peso seco alcanzado, la proteína tóxica obtenida y la glucosa consumida.

**Tabla 2.8.** Concentraciones de fuente de carbono (glucosa) y de nitrógeno (extracto de levadura) empleadas en los ensayos de estudio de la influencia de las relaciones C:N. Se indican los valores de Peso seco máximo alcanzado y los rendimientos de proteína tóxica y de biomasa en base a glucosa consumida.

| C:N   | glucosa | EL   | N <sub>total</sub> | PS <sub>máx</sub> | $Y_{p/x}$ | $Y_{p/s}$ | $Y_{r/s}$ |
|-------|---------|------|--------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|
| 0.95  | 1.9     | 8.0  | 0.8                | 2.8               | 0.19      | 0.166     | 1.14      |
| 1.26  | 1.9     | 6.1  | 0.61               | 2.4               | 0.20      | 0.113     | 1.77      |
| 1.30  | 3.6     | 11.1 | 1.11               | 3.2               | 0.22      | 0.150     | 1.46      |
| 1.73  | 3.6     | 8.3  | 0.83               | 2.7               | 0.19      | 0.099     | 1.92      |
| 1.90  | 1.9     | 4.0  | 0.40               | 1.9               | 0.18      | 0.090     | 2.00      |
| 2.60  | 3.6     | 5.5  | 0.55               | 2.6               | 0.17      | 0.127     | 1.34      |
| 2.75  | 5.5     | 8.0  | 0.80               | 3.9               | 0.22      | 0.067     | 3.30      |
| 3.55  | 7.1     | 8.0  | 0.80               | 3.8               | 0.18      | 0.060     | 3.00      |
| 3.67  | 5.5     | 6.0  | 0.60               | 3.2               | 0.18      | 0.065     | 2.77      |
| 3.80  | 1.9     | 2.0  | 0.20               | 1.5               | 0.33      | 0.140     | 2.36      |
| 4.55  | 9.9     | 8.7  | 0.87               | 4.0               | 0.19      | 0.062     | 3.06      |
| 4.70  | 7.1     | 6.0  | 0.60               | 3.5               | 0.18      | 0.066     | 2.73      |
| 5.20  | 3.6     | 2.8  | 0.28               | 2.3               | 0.23      | 0.068     | 3.38      |
| 5.50  | 5.5     | 4.0  | 0.40               | 3.2               | 0.20      | 0.060     | 3.30      |
| 6.10  | 9.9     | 6.5  | 0.65               | 4.5               | 0.21      | 0.052     | 4.04      |
| 7.10  | 7.1     | 4.0  | 0.40               | 3.6               | 0.22      | 0.055     | 4.00      |
| 9.10  | 9.9     | 4.4  | 0.44               | 3.6               | 0.19      | 0.043     | 4.42      |
| 11.00 | 5.5     | 2.0  | 0.20               | 2.2               | 0.19      | 0.050     | 3.80      |
| 14.20 | 7.1     | 2.0  | 0.20               | 2.3               | 0.17      | 0.049     | 3.47      |
| 18.20 | 9.9     | 2.0  | 0.20               | 2.2               | 0.15      | 0.100     | 1.50      |

C:N: relación carbono:nitrógeno ( $\text{g.g}^{-1}$ ). EL: extracto de levadura ( $\text{g.l}^{-1}$ ); N<sub>total</sub>: nitrógeno total ( $\text{g.l}^{-1}$ ); PS<sub>máx</sub>: peso seco máximo ( $\text{g.l}^{-1}$ );  $Y_{p/x}$ : relación entre producto y biomasa obtenidos;  $Y_{p/s}$ : rendimiento de producto en base a glucosa consumida ( $\text{g.g}^{-1}$ );  $Y_{r/s}$ : rendimiento de biomasa en base a glucosa consumida ( $\text{g.g}^{-1}$ ) (ver texto).

**Tabla 2.8b.** Concentraciones de fuente de carbono (glucosa) y de nitrógeno (extracto de levadura y sulfato de amonio) empleadas en los ensayos de estudio de la influencia de las relaciones C:N. Se indican los valores de Peso seco máximo alcanzado y los rendimientos de proteína tóxica y de biomasa en base a glucosa consumida. La concentración de sulfato de amonio fue constante e igual a  $0.47 \text{ g.l}^{-1}$ .

| C:N   | glucosa | EL   | $N_{\text{total}}$ | $PS_{\text{max}}$ | $Y_{p/x}$ | $Y_{p/s}$ | $Y_{r/s}$ |
|-------|---------|------|--------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|
| 0.95  | 1.9     | 7.0  | 0.80               | 4.36              | 0.24      | 0.227     | 1.06      |
| 1.26  | 1.9     | 5.1  | 0.61               | 3.05              | 0.23      | 0.202     | 1.14      |
| 1.30  | 3.6     | 10.1 | 1.11               | 5.35              | 0.28      | 0.232     | 1.21      |
| 1.73  | 3.6     | 7.3  | 0.83               | 3.71              | 0.24      | 0.180     | 1.33      |
| 1.90  | 1.9     | 3.0  | 0.40               | 2.48              | 0.26      | 0.171     | 1.53      |
| 2.60  | 3.6     | 4.5  | 0.55               | 3.32              | 0.27      | 0.182     | 1.50      |
| 2.75  | 5.5     | 7.0  | 0.80               | 5.23              | 0.32      | 0.149     | 2.13      |
| 3.55  | 7.1     | 7.0  | 0.80               | 5.00              | 0.33      | 0.132     | 2.5       |
| 3.67  | 5.5     | 5.0  | 0.60               | 4.46              | 0.27      | 0.097     | 2.78      |
| 3.80  | 1.9     | 1.0  | 0.20               | 1.77              | 0.23      | 0.114     | 2.02      |
| 4.55  | 9.9     | 7.7  | 0.87               | 5.91              | 0.27      | 0.097     | 2.78      |
| 4.70  | 7.1     | 5.0  | 0.60               | 4.52              | 0.26      | 0.089     | 2.92      |
| 5.20  | 3.6     | 1.8  | 0.28               | 3.24              | 0.22      | 0.134     | 1.64      |
| 5.50  | 5.5     | 3.0  | 0.40               | 4.46              | 0.26      | 0.068     | 3.82      |
| 6.10  | 9.9     | 5.5  | 0.65               | 5.32              | 0.26      | 0.068     | 3.82      |
| 7.10  | 7.1     | 3.0  | 0.40               | 4.52              | 0.23      | 0.066     | 3.48      |
| 9.10  | 9.9     | 3.4  | 0.44               | 5.51              | 0.22      | 0.069     | 3.19      |
| 11.00 | 5.5     | 1.0  | 0.20               | 2.99              | 0.24      | 0.069     | 3.48      |
| 14.20 | 7.1     | 1.0  | 0.20               | 2.71              | 0.33      | 0.100     | 3.29      |
| 18.20 | 9.9     | 1.0  | 0.20               | 3.60              | 0.24      | 0.076     | 3.16      |

C:N: relación carbono:nitrógeno ( $\text{g.g}^{-1}$ ). EL: extracto de levadura ( $\text{g.l}^{-1}$ );  $N_{\text{total}}$ : nitrógeno total ( $\text{g.l}^{-1}$ );  $PS_{\text{max}}$ : peso seco máximo ( $\text{g.l}^{-1}$ );  $Y_{p/x}$ : relación entre producto y biomasa obtenidos;  $Y_{p/s}$ : rendimiento de producto en base a glucosa consumida ( $\text{g.g}^{-1}$ );  $Y_{r/s}$ : rendimiento de biomasa en base a glucosa consumida ( $\text{g.g}^{-1}$ ) (ver texto).

El estudio de la biomasa alcanzada en los ensayos permite ver que ésta disminuye al aumentar la relación carbono:nitrógeno para un valor de concentración

de glucosa constante (ver Figura 2.1). Esto es esperable debido a que el aumento de dicha relación implica la posibilidad de que los medios queden limitados por nitrógeno. La misma tendencia se observa cuando se analizan las relaciones  $Y_{p/s}$  e  $Y_{p/x}$ . Sin embargo, en todos los casos se verifica que los valores alcanzados en medios suplementados con sulfato de amonio son superiores a los alcanzados en los medios donde la única fuente de nitrógeno fue extracto de levadura.

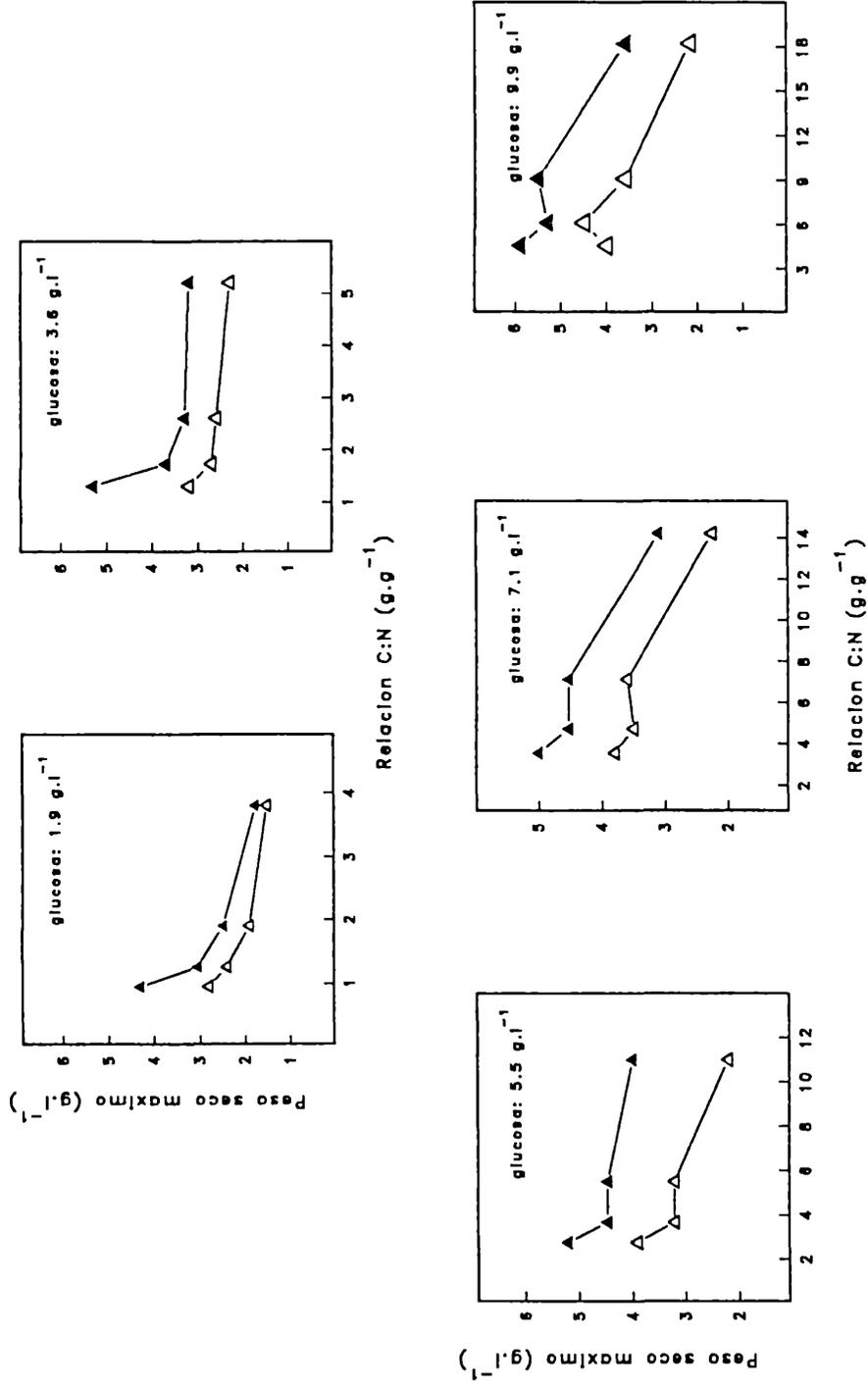
Los valores de rendimiento en biomasa calculados no pueden emplearse como indicadores del buen desarrollo, debido a que las elevadas concentraciones de extracto de levadura usadas en estos medios de cultivo aportan una gran cantidad de compuestos carbonados que los microorganismos son capaces de emplear como fuentes de carbono, enmascarándose así los verdaderos valores de  $Y_{x/s}$ .

Respecto de los sustratos limitantes, puede verse que, en los medios con concentración de nitrógeno igual a  $0.2 \text{ g.l}^{-1}$  (sin sulfato de amonio), la concentración de biomasa final es constante para concentraciones de glucosa mayores que  $6 \text{ g.l}^{-1}$  (Figura 2.2), lo cual indica que, en esas condiciones, los cultivos están limitados por nitrógeno. Para concentraciones de nitrógeno mayores que este valor el sustrato limitante es la glucosa, dentro del intervalo de concentraciones ensayadas (Figuras 2.3 - 2.5). Sin embargo esta situación no se encuentra en los medios suplementados con sulfato de amonio. En ellos siempre fue la glucosa el sustrato limitante.

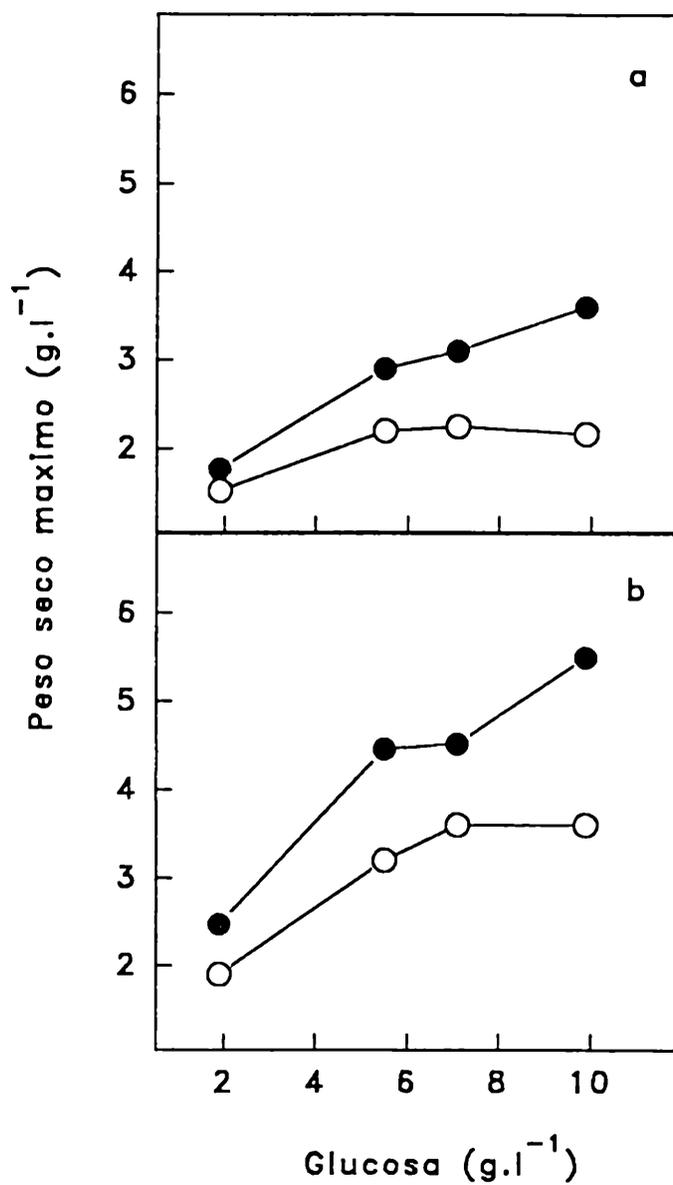
Por lo tanto, glucosa es limitante del crecimiento en concentraciones menores que  $7 \text{ g.l}^{-1}$ , y el nitrógeno lo es en concentraciones menores que  $0.2 \text{ g.l}^{-1}$ . Altas concentraciones de extracto de levadura aportan compuestos carbonados que pueden ser empleados como fuentes de carbono por el microorganismo. Asimismo, se puede determinar que es necesario suplementar los medios con sulfato de amonio.

También fue estudiada la relación entre la proteína ( $\delta$ -endotoxina) formada y el sustrato consumido. Cuando la fuente de nitrógeno es extracto de levadura y la concentración de glucosa es menor que  $7 \text{ g.l}^{-1}$ , la cantidad de proteína formada por gramo de sustrato consumido ( $Y_{p/s}$ ) aumenta al disminuir la relación carbono:nitrógeno, llegando a un valor máximo de  $Y_{p/s} = 0.166 \text{ g.g}^{-1}$ . Para concentraciones mayores, cualquiera sea la concentración de N, el valor de  $Y_{p/s}$  se mantiene constante, alrededor de  $0.06 \text{ g.g}^{-1}$ . Otra vez se dificulta el análisis de los valores obtenidos, debido a la elevada concentración de extracto de levadura en los

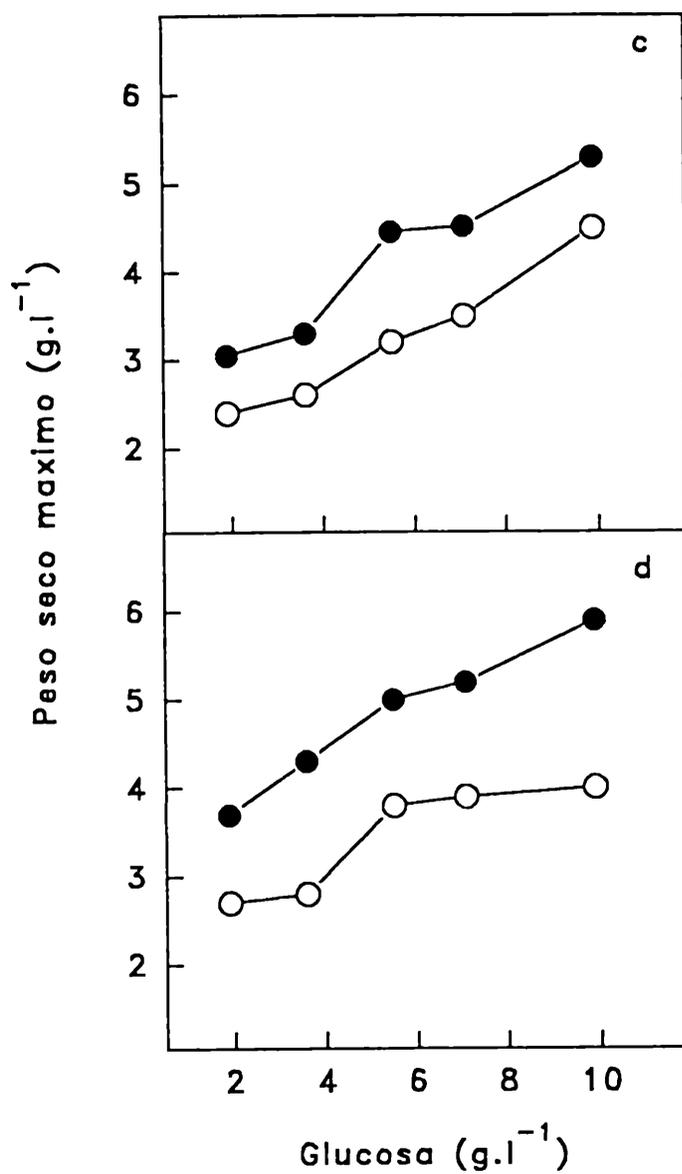
**Figura 2.1.** Concentración máxima de biomasa alcanzada en cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en medios con diferentes relaciones carbono:nitrógeno.  $\Delta$ : fuente de nitrógeno: extracto de levadura;  $\blacktriangle$ : extracto de levadura + sulfato de amonio. Contenido de nitrógeno en el extracto de levadura: 9.9 %.



**Figura 2.2.** Concentración máxima de biomasa alcanzada en función de la concentración de glucosa, en cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* con distintas concentraciones de nitrógeno. **a:** concentración de nitrógeno  $0.2 \text{ g.l}^{-1}$ ; **b:** concentración de nitrógeno  $0.4 \text{ g.l}^{-1}$ .



**Figura 2.2 (continuación).** Concentración máxima de biomasa alcanzada en función de la concentración de glucosa, en cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* con distintas concentraciones de nitrógeno. **c:** concentración de nitrógeno  $0.6 \text{ g.l}^{-1}$ ; **d:** concentración de nitrógeno  $0.8 \text{ g.l}^{-1}$ .



medios con baja relación carbono:nitrógeno. Aún así, puede verse que los medios con sulfato de amonio presentan una mayor relación  $Y_{p/s}$  que aquellos no suplementados.

Es necesario destacar que en los medios con sulfato de amonio con concentraciones de glucosa mayores que  $7 \text{ g.l}^{-1}$  la concentración de biomasa alcanzada fue siempre mayor que  $3.5 \text{ g.l}^{-1}$ , excepto para el caso en que la concentración de nitrógeno fue  $0.2 \text{ g.l}^{-1}$ . Esta situación puede promover la limitación de los cultivos por oxígeno. En frascos agitados, la máxima velocidad de transferencia de oxígeno llega a valores de alrededor de  $35 \text{ mmol O}_2\text{.l}^{-1}\text{.h}^{-1}$ . *Bacillus thuringiensis* presenta valores de velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{max}}$ ) y de rendimiento de biomasa en base a oxígeno ( $Y_{x/o}$ ) tales que, para concentraciones de biomasa cercanas a  $3.5 \text{ g.l}^{-1}$ , el consumo de oxígeno es de alrededor de  $32 \text{ mmol O}_2\text{.l}^{-1}\text{.h}^{-1}$ .<sup>2</sup> Por lo tanto, los experimentos donde la concentración de biomasa excede ese valor "límite" de  $3.5 \text{ g.l}^{-1}$  podrían llegar a estar limitados en oxígeno, con las consecuentes incertezas en los resultados obtenidos (ver Capítulo 4).

El análisis hasta aquí desarrollado permite seleccionar un medio donde la concentración de sustratos sea tal que la biomasa no supere esa concentración límite.

#### 2.4.3. RELACION ENTRE EXTRACTO DE LEVADURA Y SULFATO DE AMONIO.

Dado que la presencia de sulfato de amonio es necesaria para obtener niveles de biomasa y de toxina más elevados, es necesario ajustar su concentración inicial en relación con la concentración de extracto de levadura. Se ensayaron distintas combinaciones de extracto de levadura y de sulfato de amonio, manteniendo la concentración de nitrógeno constante ( $0.2 \text{ g.l}^{-1}$ ), para estudiar la producción de  $\delta$ -endotoxina y su variación con la relación entre nitrógeno orgánico (aportado por el extracto de levadura) y el nitrógeno inorgánico (aportado por el amonio). Las distintas combinaciones, y los resultados obtenidos, se presentan en la Tabla 2.9.

---

<sup>2</sup>En Secciones posteriores se profundizará acerca de la relación entre oxígeno y crecimiento de *Bacillus thuringiensis*

**Tabla 2.9.** Ensayos para determinar la relación adecuada entre las fuentes de nitrógeno orgánica (extracto de levadura) e inorgánica (sulfato de amonio).

| Medio | EL   | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | δ-endotoxina | PS <sub>max</sub> |
|-------|------|---|--------------|-------------------|
| 1     | 0.67 | 0.63  | 0.422        | 2.79              |
| 2     | 1.00 | 0.47  | 0.433        | 2.66              |
| 3     | 1.66 | 0.16  | 0.400        | 2.75              |
| 4     | 2.00 | --  | 0.307        | 2.40              |

EL: extracto de levadura (g.l<sup>-1</sup>). PS<sub>max</sub>: peso seco máximo (g.l<sup>-1</sup>). La concentración de glucosa empleada fue de 7 g.l<sup>-1</sup>. La relación C:N es 14. Los resultados corresponden a la media de cuatro determinaciones.

El extracto de levadura, como única fuente de nitrógeno, no es suficiente para asegurar un buen nivel de δ-endotoxina. Las diferencias son de muy alto grado de significación (*test t*) entre el Medio 4 (2 g.l<sup>-1</sup> de extracto de levadura) y los otros tres medios ( $P < 0.005$ ); las diferencias entre los otros tres medios presentan un alto grado de significación ( $P < 0.01$ ), excepto entre los Medios 1 y 3. El valor de  $Y_{p'x}$  alcanzado en el Medio 2 es, entonces, mayor que el alcanzado en los otros Medios, con alto grado de significación.

Estos resultados permiten concluir que es necesaria la presencia de amonio en los medios, y que, para 7 g.l<sup>-1</sup> de glucosa, la concentración adecuada de sulfato de amonio es de 0.47 g.l<sup>-1</sup>, lo cual significa que el 50 % del nitrógeno debe ser aportado bajo la forma de dicho ión. Así, la relación adecuada entre los principales componentes de los medios puede establecerse como glucosa, 7 g.l<sup>-1</sup>: extracto de levadura, 1 g.l<sup>-1</sup>: sulfato de amonio 0.47 g.l<sup>-1</sup>.

## 2.5. CONCLUSIONES.

Los resultados discutidos hasta este punto permiten extraer las siguientes conclusiones:

- No es posible el empleo de medios sintéticos para cultivar *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y alcanzar concentraciones apreciables, al menos en tiempos de cultivo cortos.
- Ciertos componentes presentes en el extracto de levadura, esenciales para el crecimiento del microorganismo, no pueden ser reemplazados por vitaminas, sales y micronutrientes.
- De todos modos, es posible disminuir la concentración de extracto de levadura en los medios de cultivo de uso habitual.
- La presencia de sulfato de amonio en los medios provoca un aumento significativo de la producción de  $\delta$ -endotoxina
- Es posible determinar una relación adecuada de los componentes de los medios de cultivo con la cual el nivel de toxina alcanzado en relación a la concentración de biomasa final es máximo, al menos para cultivos discontinuos en frascos agitados.

---

3 Cultivos batch de *Bacillus*  
*thuringiensis* var. *israelensis*

---

### 3.1. INTRODUCCION.

Como es sabido, un cultivo *batch*<sup>1</sup> es aquel en el cual un microorganismo es inoculado en un medio donde todos los nutrientes indispensables para su crecimiento están presentes en exceso.

Los cultivos microbianos pueden ser clasificados en abiertos y cerrados. Un cultivo abierto es aquel en el que cualquiera de los materiales que lo componen pueden ingresar o egresar. Un cultivo es cerrado, en cambio, si alguna parte esencial del mismo no puede ingresar o egresar.

Un cultivo en batch, que consiste en una cantidad inicial limitada de medio nutritivo, es un ejemplo de sistema cerrado; en este tipo de sistemas la velocidad de crecimiento de la biomasa tenderá a cero, ya sea por el agotamiento de algún nutriente o por la acumulación de algún inhibidor. Estos sistemas están siempre en *estado transitorio*, a diferencia de los sistemas abiertos donde existe la posibilidad de alcanzar un *estado estacionario*.

Cuando un microorganismo es inoculado en un medio de cultivo, en el cual están presentes, en exceso, todos los nutrientes necesarios para su crecimiento, suele observarse una fase, de duración variable, durante la cual no se verifica crecimiento alguno; es la llamada fase de letargo o fase *lag*. La duración de esta fase puede reducirse mediante la modificación del medio de cultivo, de las condiciones de cultivo y del tamaño del inóculo.

Luego de la fase lag, se observa que la concentración de biomasa varía de modo exponencial (fase exponencial de crecimiento); en esta fase la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) es máxima y constante. La duración de la fase exponencial depende de la población inicial de células en el medio (inóculo). Por lo general, la velocidad específica de crecimiento se relaciona con la concentración de sustrato en el medio de cultivo, según la expresión dada por Monod:

---

<sup>1</sup>A pesar de la existencia de las expresiones castellanas "cultivo discontinuo", "cultivo por lotes" o "cultivo por cargas", la expresión inglesa *batch culture* es de uso común. Por lo tanto, un cultivo discontinuo será llamado, en este trabajo, un cultivo batch.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}$$

$K_s$  es una medida de la afinidad del microorganismo por el sustrato limitante del crecimiento; cuanto menor es  $K_s$ , mayor es la afinidad, y mayor su capacidad para crecer a alta velocidad en presencia de bajas concentraciones de sustrato limitante. En sistemas cerrados de cultivo, tal como lo es el batch,  $K_s$  tiene un valor poco significativo, pues la mayor parte del crecimiento ocurre cuando los sustratos están presentes en exceso ( $s \gg K_s$  y, por lo tanto,  $\mu = \mu_{max}$ ). Para la mayor parte de los microorganismos, los valores de  $K_s$  para carbohidratos son del orden de  $\text{mg.l}^{-1}$ , mientras que para compuestos poco usuales, o no naturales, pueden ser mucho mayores (es decir, hay baja afinidad).

En general, la producción de *Bacillus thuringiensis* es llevada a cabo mediante cultivos batch (Rowe y Margaritis 1987; Priest y Sharpe 1989). En un medio con suficiente concentración de carbono, nitrógeno y fósforo, los bacilos crecen en forma vegetativa y la esporulación se ve suprimida (Dawes y Mandelstam 1970). Cuando la concentración de los azúcares en el medio disminuye hasta cerca de la mitad de la concentración inicial, comienzan a sintetizarse las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, a causa de la disminución de la represión catabólica ejercida, en este caso, por la glucosa. Esta es la fase de transición, y en ella son catabolizados los ácidos que han sido formados durante el crecimiento vegetativo. Por último, comienza la fase de esporulación, en la que se observa la formación de los esporos como cuerpos refringentes de forma elíptica. Al mismo tiempo comienzan a detectarse, cerca del espora en formación, unos cuerpos o inclusiones de forma irregular, cuya refringencia aumenta al progresar la esporulación; son los cristales de  $\delta$ -endotoxina. En breve, puede decirse que el *pattern* metabólico de *Bacillus thuringiensis* es trifásico: crecimiento vegetativo, transición y esporulación. Otros aspectos del metabolismo de *Bacillus thuringiensis* serán discutidos con mayor detalle en Capítulos posteriores de este trabajo.

### 3.2. ENSAYOS EN TANQUES AGITADOS.

Todos los ensayos discutidos en el Capítulo 2 fueron cultivos batch realizados en frascos agitados. Estos son de limitada utilidad cuando se necesita

conocer las características del proceso fermentativo con mayor detalle. En este caso se emplean sistemas de cultivo provistos de un mayor nivel de control de los parámetros involucrados en el proceso de crecimiento; para ello suelen emplearse biorreactores (o fermentadores), equipos que, provistos de sensores específicos y demás instrumentación periférica, permiten controlar la temperatura y el pH del cultivo, el análisis de gases de salida del fermentador, la determinación del nivel de oxígeno disuelto en el medio, etcétera.

### 3.2.1. PARAMETROS DE CRECIMIENTO.

La observación cuantitativa del cultivo de un microorganismo permite realizar un análisis de los distintos parámetros de crecimiento; estos se definen con referencia al crecimiento de un microorganismo en un cultivo batch homogéneo, es decir un medio de cultivo inoculado con el microorganismo a estudiar, en condiciones de mezclado tales que dispersen a la biomasa y que mantengan al sistema libre de gradientes de concentración (mezclado perfecto).

Los parámetros de crecimiento que suelen ser de interés son la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  (y el tiempo de duplicación de la biomasa  $t_d$ ), la duración de la fase de letargo (tiempo *lag* o  $t_{lag}$ ), los rendimientos celulares, las velocidades de consumo de sustrato y de oxígeno, las velocidades de producción de dióxido de carbono y de producto, y la máxima concentración de biomasa. Todos estos parámetros son bien conocidos, y sería ocioso volver a definirlos en este trabajo. Sin embargo, es necesario hacer alguna referencia a los límites que presenta la concentración de biomasa.

La máxima concentración de biomasa que puede llegar a alcanzarse en un medio de cultivo dado está determinada (limitada) por alguna de las siguientes condiciones (Pirt 1975): a) la cantidad inicial de sustrato limitante del crecimiento; b) la acumulación de productos inhibitorios; c) la máxima densidad de empaquetamiento de la biomasa; y d) la muerte de las células.

El tercer punto es de interés, pues se puede demostrar que, si la inhibición se suprime, si la población celular permaneciera viable, y si no hubiera limitaciones al suministro de nutrientes en ningún momento del cultivo (situaciones posibles de ser alcanzadas mediante el empleo de diversas estrategias de cultivo), el único límite

impuesto a la concentración de biomasa sería la máxima densidad de empaquetamiento de las células. Esta puede calcularse según la expresión  $10^{12}/v$  ( $v$  = volumen de una célula en  $\mu\text{m}^3$ ). Las densidades máximas posibles corresponden a concentraciones de biomasa de alrededor de  $100 \text{ g.l}^{-1}$  (peso seco). Para *Bacillus megaterium* ( $7.6 \times 1.2 \mu\text{m}$ ), la densidad máxima posible es de alrededor de  $2.9 \times 10^{10} \text{ células.ml}^{-1}$  (Pirt 1975).

### 3.2.2. OBJETIVOS DE ESTA ETAPA.

Los experimentos detallados en este Capítulo apuntan a la descripción y caracterización de cultivos en batch de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, con el fin de determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos propios del microorganismo. Asimismo, resulta de interés el estudio de los cultivos de este bacilo en medios de elevada concentración de nutrientes, con el fin de determinar el efecto de estos sobre la toxicidad, el nivel de esporulación y la concentración de biomasa.

## 3.3. MATERIALES Y METODOS

3.3.1. MICROORGANISMO. La cepa de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* tuvo el mismo origen que la empleada en los cultivos en frascos agitados (ver Capítulo 2, Materiales y Métodos, Sección 2.3.1.), y fue mantenida del modo descrito en las secciones correspondientes.

3.3.2. INÓCULOS Y MEDIOS DE CULTIVO. Los inóculos fueron preparados por resuspensión, con agua destilada estéril, del desarrollo de los tubos de agar nutritivo. Erlenmeyer de 1 l de capacidad, conteniendo 100 ml de medio de cultivo estéril, fueron sembrados con 2 ml de la suspensión. Luego de 8 h de incubación, a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $200 \text{ rev.min}^{-1}$ , los medios fueron empleados para inocular el biorreactor (ver 2.3.3.)

3.3.3. MEDIOS DE CULTIVO. La composición del medio de cultivo testigo XI empleado en estos ensayos fue ( $\text{g.l}^{-1}$ ): glucosa, 7; extracto de levadura, 1;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.47;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.05;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.08;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.5 ( $\text{pH} = 6.8$ ). Los componentes del medio se esterilizan

en autoclave, a 121 °C, durante 15 min. La esterilización fue realizada por separado para evitar interacciones no deseadas entre los componentes. Las composiciones de los medios X7 y X15, empleados en los ensayos de medios de cultivo concentrados, se presentan en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Composición de los Medios empleados en los ensayos de altas concentraciones de nutrientes.

| componente                                      | medio X7 | medio X15 |
|---|----------|-----------|
| glucosa   | 50       | 100       |
| extracto de levadura                            | 7        | 15        |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 3.3      | 7         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 10.5     | 22.5      |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 10.5     | 22.5      |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 3.5      | 7.5       |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O            | 0.56     | 1.2       |
| MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O             | 0.35     | 0.75      |

3.3.4. CONDICIONES DE CULTIVO. Los cultivos se llevaron a cabo en reactores de 6 l (LKB Ultraferm 1601D), con un volumen de trabajo de 4 l. La temperatura del cultivo fue de 30 °C, la velocidad de aireación de 4 l.min<sup>-1</sup> y la velocidad de agitación 500 rev.min<sup>-1</sup>. La agitación fue manipulada con el fin de asegurar que la concentración de oxígeno disuelto fuera, en todo momento, superior a 50 %.

3.3.5. ANALISIS DE GASES. Los gases de salida del fermentador fueron analizados para determinar las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono. Estas medidas fueron realizadas utilizando detectores específicos para oxígeno (Beckman OM-14 Oxygen Analyzer) y para dióxido de carbono (Horiba PIR 2000 Infrared Analyzer).

3.3.6. OXIGENO DISUELTO. El oxígeno disuelto en el medio de cultivo fue determinado mediante el empleo de un electrodo de oxígeno disuelto, esterilizable, de tipo galvánico. El electrodo se calibra (luego de la esterilización) del siguiente

modo: se ajusta el valor de 0 % de oxígeno disuelto mediante el barrido del reactor con nitrógeno. Luego se ajustan las condiciones de agitación y aireación iniciales de cultivo, y, luego de alcanzar una lectura estable, se le asigna el valor de 100 % de O<sub>2</sub> disuelto. Como se mencionó más arriba, la concentración de oxígeno disuelto fue mantenida en valores superiores a 50 %, para evitar posibles limitaciones por oxígeno.

3.3.7. DETERMINACIONES ANALITICAS. Las concentraciones de biomasa y de  $\delta$ -endotoxina, los recuentos de esporos, y las concentraciones de nitrógeno total, de amonio y de glucosa fueron realizados tal como se describiera en el Capítulo 2 (Secciones 2.3.5.1. y siguientes).

### 3.4. RESULTADOS Y DISCUSION.

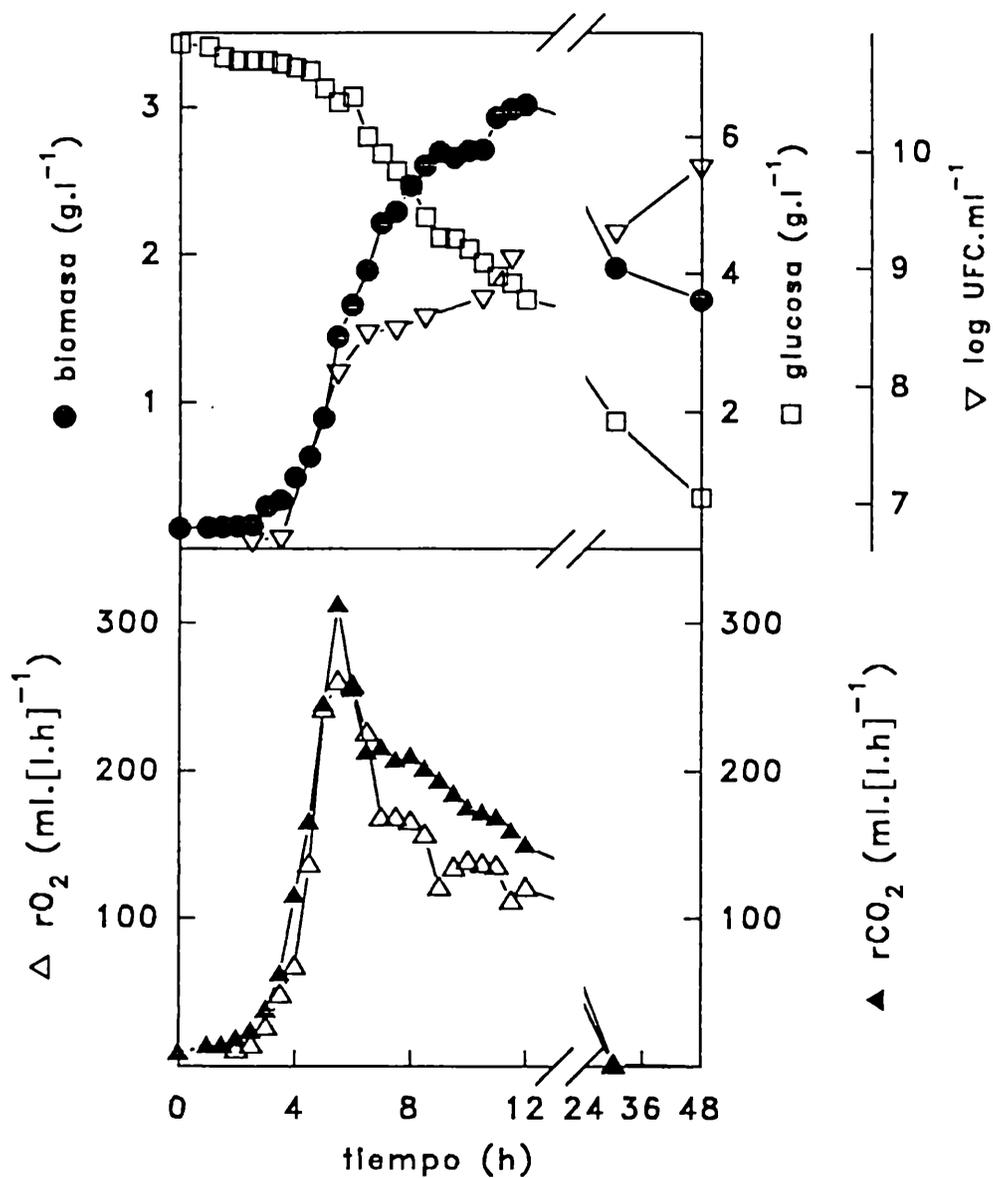
Las curvas de crecimiento de biomasa, de variación de la concentración de sustrato y de aparición de unidades formadoras de colonias se presentan en la Figura 3.1. Estas curvas son típicas del crecimiento de *Bacillus thuringiensis* (Lüthy *et al.* 1982; Rowe y Margaritis 1987), que fuera descrito en la introducción al Capítulo. A partir de los datos experimentales es posible calcular los parámetros de crecimiento de interés, tales como velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), rendimientos de biomasa en base a sustrato ( $Y_{x/s}$ ) y a oxígeno ( $Y_{x/o}$ ), velocidades de consumo de oxígeno ( $rO_2$ ) y de producción de dióxido de carbono ( $rCO_2$ ). Estos valores se muestran en la Tabla 3.1, donde también se presentan datos informados por otros autores.

**Tabla 3.2.** Resultados obtenidos en cultivos batch empleando el Medio X1, y su comparación con resultados de la literatura.

| Microorganismo          | $\mu$    | $Y_{x/s}$ | $Y_{x/o}$ | $qO_2max$ | Recuento          | Referencia                    |
|-------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-------------------------------|
| BT <i>israelensis</i>   | 0.67     | 0.62      | 1.45      | 0.46      | $9 \times 10^8$   | Este trabajo <sup>1</sup>     |
| BT <i>kurstaki</i>      | 0.77     | 0.56      | 1.50      | 0.51      | $10 \times 10^8$  | Arcas <i>et al.</i> 1987      |
| BT <i>galleriae</i>     | 0.48-0.9 | 0.82      | ?         | ?         | $1.2 \times 10^8$ | Sakharova <i>et al.</i> 1984  |
| BT <i>galleriae</i>     | 1.40     | ?         | ?         | ?         | $1 \times 10^6$   | Sakharova <i>et al.</i> 1985  |
| BT NCIB 9512            | 0.3-0.6  | ?         | 1.28      | 0.28-0.42 | ?                 | Moraes <i>et al.</i> 1980     |
| BT <i>kumamotoensis</i> | 0.2-0.3  | 0.50      | ?         | 0.21-0.49 | ?                 | Medrano-R. <i>et al.</i> 1993 |
| BT <i>thuringiensis</i> | 1.30     | ?         | ?         | ?         | ?                 | Holmberg <i>et al.</i> 1980   |

<sup>1</sup>Resultados promedio de cuatro cultivos.  $\mu$ : velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ );  $Y_{x/s}$ : rendimiento [g biomasa.(g sustrato)<sup>-1</sup>];  $Y_{x/o}$ : rendimiento [g biomasa.(g oxígeno)<sup>-1</sup>];  $qO_2max$ : velocidad específica máxima de consumo de  $O_2$  [g  $O_2$ .(g biomasa. h)<sup>-1</sup>]; Recuento: UFC.ml<sup>-1</sup>

**Figura 3.1.** Curvas de crecimiento de biomasa, aparición de esporos, consumo de glucosa y de oxígeno, y de producción de dióxido de carbono en cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en Medio X1.



Los valores de rendimiento en base a sustrato alcanzados en estos experimentos,  $Y_{x's} = 0.62 \pm 0.05 \text{ g.g}^{-1}$ , son algo más elevados que los informados para *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* ( $0.56 \text{ g.g}^{-1}$ ) por Arcas *et al.* (1987) y que los presentados por Medrano-Roldán *et al.* 1993) para la variedad *kumamotoensis* ( $Y_{x's} = 0.50 - 0.55 \text{ g.g}^{-1}$ ).

Los valores de  $Y_{x'o} = 1.45 \pm 0.05 \text{ g.g}^{-1}$  son coincidentes con los reportados para la variedad *kurstaki* y con los que pueden calcularse a partir de los datos reportados por Moraes *et al.* (1980), dentro de los límites del error de la determinación.

El valor de  $\mu_{max}$  (calculado como la pendiente de la recta que se obtiene al graficar el logaritmo de la concentración de biomasa contra el tiempo, en el intervalo correspondiente a la fase exponencial) fue de  $0.67 \text{ h}^{-1}$ . Este valor es muy alto comparado con los reportados para la variedad *kumamotoensis* ( $0.2 - 0.3 \text{ h}^{-1}$ ). Para la variedad *thuringiensis* (Holmberg *et al.* 1980) han sido informado valores de  $\mu_{max}$  de  $1.30 \text{ h}^{-1}$ , mientras que para la variedad *galleriae* se observa una cierta dispersión en los valores de  $\mu_{max}$  informados. Sakharova *et al.* (1984) presentan valores de  $\mu_{max}$  entre  $0.48$  y  $0.91 \text{ h}^{-1}$  para la variedad *galleriae* cultivada en distintos medios de cultivo, bajo distintas limitaciones de nutrientes, pero los mismos autores (Sakharova *et al.* 1985) informan un valor de  $\mu_{max}$  de  $1.40 \text{ h}^{-1}$ . Sin embargo, los experimentos informados en primer término parecen haber sido realizados en condiciones de limitación por oxígeno (100 ml de medio de cultivo en frascos de 250 ml de capacidad).

Los esporos (como unidades formadoras de colonias resistentes al calor) se hicieron detectables a partir de las 14 horas de cultivo. El recuento final alcanzado fue de  $9 \times 10^8 \text{ UFC.ml}^{-1}$ , un valor típico para los cultivos de *Bacillus thuringiensis*. La concentración de  $\delta$ -endotoxina fue de  $385 \text{ mg.l}^{-1}$ , y la potencia tóxica (frente a larvas de *Culex pipiens*) fue de 5100 UTI por cada  $10^8 \text{ UFC}$ , valor que cae dentro del intervalo que puede calcularse a partir de los datos presentados por Pearson y Ward (1988) para cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en diversos medios de cultivo.

### 3.4.1. MEDIOS CONCENTRADOS.

Uno de los objetivos de esta etapa es la obtención de medios de cultivo con concentraciones de nutrientes tales que permitan el desarrollo de altas concentraciones de microorganismos. Por lo tanto es necesario el ensayo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en medios más concentrados. Los medios de cultivo empleados fueron el medio X7, donde las concentraciones de todos los nutrientes se incrementaron alrededor de 7 veces respecto del medio X1, y el Medio X15 (ídem, pero 15 veces concentrado). Las condiciones de trabajo fueron seleccionadas teniendo en cuenta las limitaciones a la transferencia de oxígeno causadas por las elevadas concentraciones de nutrientes (Schumpe *et al.* 1982), así como el elevado consumo de oxígeno que pueden causar las altas concentraciones de biomasa<sup>2</sup>.

Los resultados de estos cultivos se presentan en Tabla 3.3, y las curvas de crecimiento en la Figura 3.2.

**Tabla 3.3.** Resultados alcanzados en los Medios X1, X7 y X15.

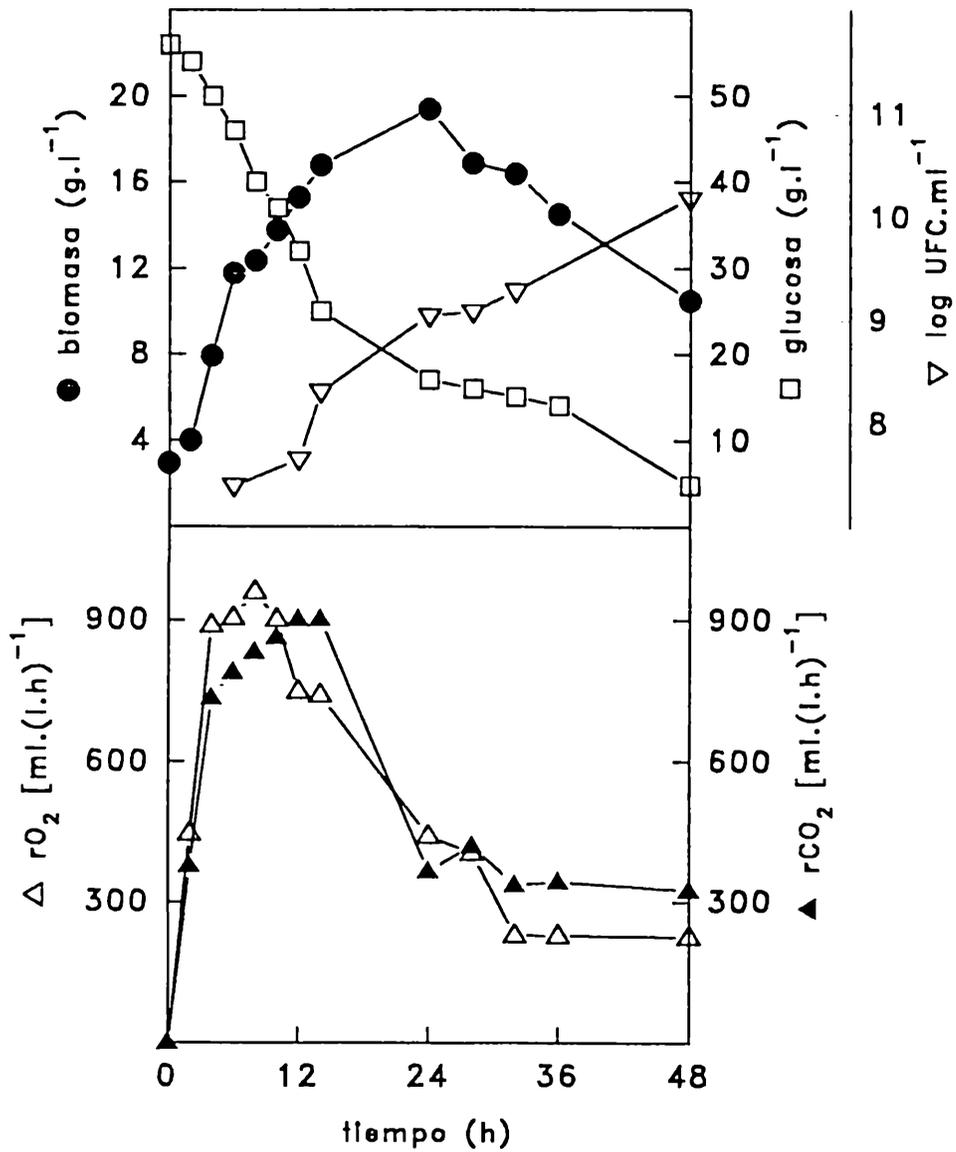
| Medio | $\mu_{max}$ | $Y_{v/x}$ | $Y_{v/o}$ | $qO_{2max}$ | Recuento         | $\delta$ -endotoxina |
|-------|-------------|-----------|-----------|-------------|------------------|----------------------|
| X1    | 0.67        | 0.62      | 1.45      | 0.46        | $9 \times 10^8$  | 385                  |
| X7    | 0.24        | 0.44      | 0.77      | 0.35        | $15 \times 10^9$ | 1840                 |
| X15   | 0.16        | 0.36      | 0.61      | 0.26        | $2 \times 10^5$  | ---                  |

Nomenclatura: ver nota al pie de Tabla 3.2

La concentración de biomasa máxima alcanzada en X7 fue de  $19.4 \text{ g.l}^{-1}$ ; este valor es bajo, si se lo compara con el esperado asumiendo un valor de  $Y_{x/s}$  igual al de los cultivos batch en medio X1. El recuento de esporos (como unidades formadoras de colonias resistentes al calor) fue de  $15 \times 10^9 \text{ UFC.ml}^{-1}$ , y el valor de

<sup>2</sup>Estudios sobre el requerimiento de oxígeno de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* serán discutidos con más detalle en el Capítulo 4.

**Figura 3.2.** Curvas de crecimiento de biomasa, aparición de esporos, consumo de glucosa y de oxígeno, y de producción de dióxido de carbono en cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en Medio X7.



la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) en este medio de cultivo fue de  $0.24 \text{ h}^{-1}$ , mucho menor que el hallado en medios no concentrados; esto indicaría la existencia de algún tipo de inhibición en el crecimiento.

Los resultados del ensayo realizado en el medio X15 y las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en Tabla 3.3 y en la Figura 3.3. Debe notarse que el valor de la velocidad específica de crecimiento fue muy bajo ( $0.16 \text{ h}^{-1}$ ), y que la máxima concentración de biomasa alcanzada ( $38.2 \text{ g.l}^{-1}$ ) es mucho menor que el valor esperado si el rendimiento fuera el mismo que en el medio X1, al igual que lo observado en el medio X7. Se debe destacar que desde las 10 horas de cultivo pudieron observarse, en la región polar de las células, cuerpos refringentes con características distintas a las de los esporos y a las de los cristales: menor tamaño, menor refringencia, forma irregular. Luego de 36 horas de cultivo no se observaron esporos, aunque los cuerpos refringentes continuaban presentes. Debido a esta anomalía, el cultivo fue controlado hasta pasadas 96 horas. En este momento se pudieron observar células deformadas, alargadas y de menor diámetro, formando filamentos muy largos (ver Figura 3.4); no se detectaron esporos ni cristales.

Arcas *et al.* (1987) encuentran, para *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, un efecto similar sobre  $\mu_{max}$  cuando se incrementa la concentración de nutrientes. Asimismo, la supresión de la esporulación en medios concentrados fue informada en bibliografía por Sakharova *et al.* (1989) para *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*, pero no fue observada por Arcas *et al.* (1987) en cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Es posible que la disminución de los valores de  $\mu$  sea debida a la baja actividad acuosa,  $a_w$ , de los medios o al efecto de inhibición por sustrato.

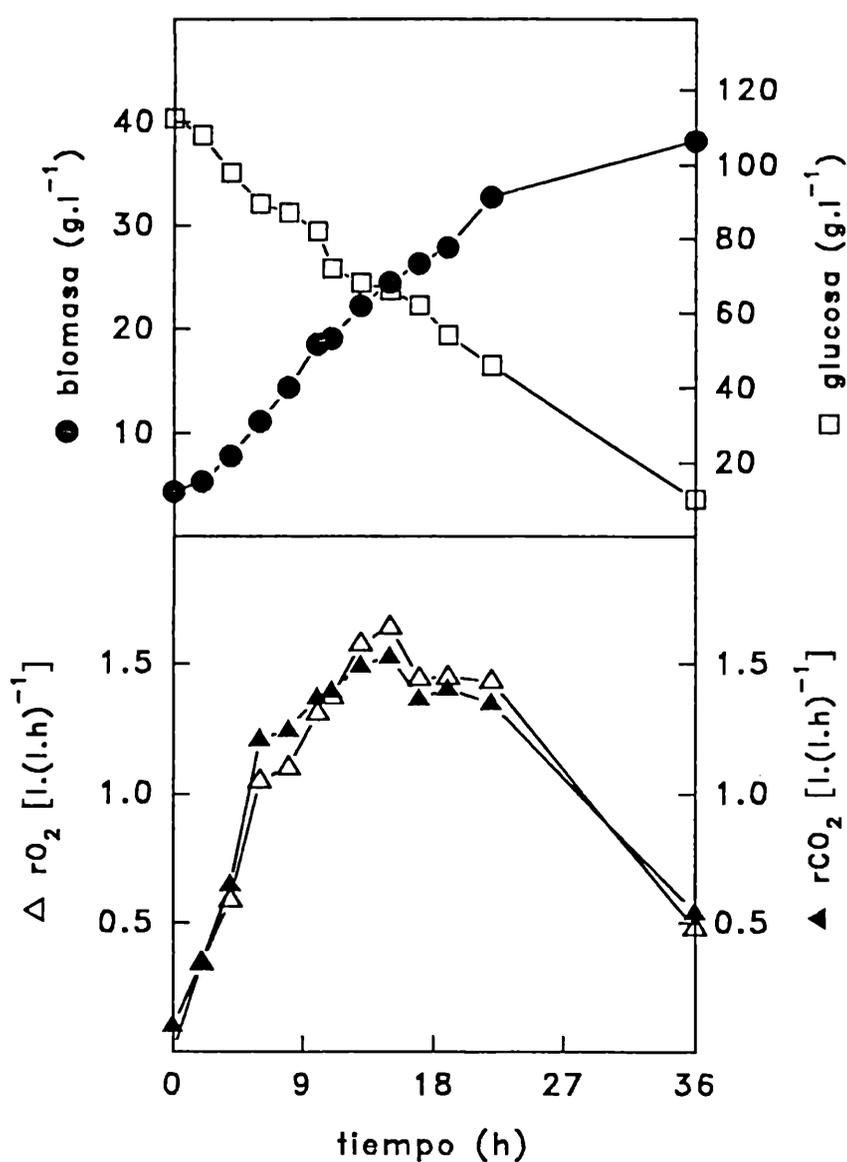
Según Pirt (1975), el  $Y_{x/o}$  máximo teórico puede estimarse asumiendo que por cada átomo de oxígeno se forman dos moles de ATP ( $P/O = 2$ ). Así, tomando  $Y_{ATP} = \text{g biomasa} \cdot (\text{mol ATP})^{-1}$ , será:

$$2 \cdot Y_{ATP} \cdot (P / O) = Y_{x/o}$$

Por lo tanto, la disminución de  $Y_{x/o}$  (tal como ocurre en el caso de los cultivos con altas concentraciones de nutrientes) puede deberse a dos causas: a) la disminución del  $Y_{ATP}$  por aumento del mantenimiento celular o bien por las llamadas *spilling reactions*, es decir reacciones metabólicas en las que se puede consumir ATP sin otro fin aparente, y b) la eventual disminución de la relación P/O,

es decir que se producen menos moles de ATP por gramo de oxígeno consumido (tal como ocurre cuando alguno de los sitios de fosforilación desaparece). Cualquiera sea el caso, es evidente que la alta concentración de nutrientes es causante de la disminución de los valores de  $Y_{x'0}$ .

**Figura 3.3.** Curvas de crecimiento de biomasa, de consumo de glucosa y de oxígeno, y de producción de dióxido de carbono en cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en Medio X15.

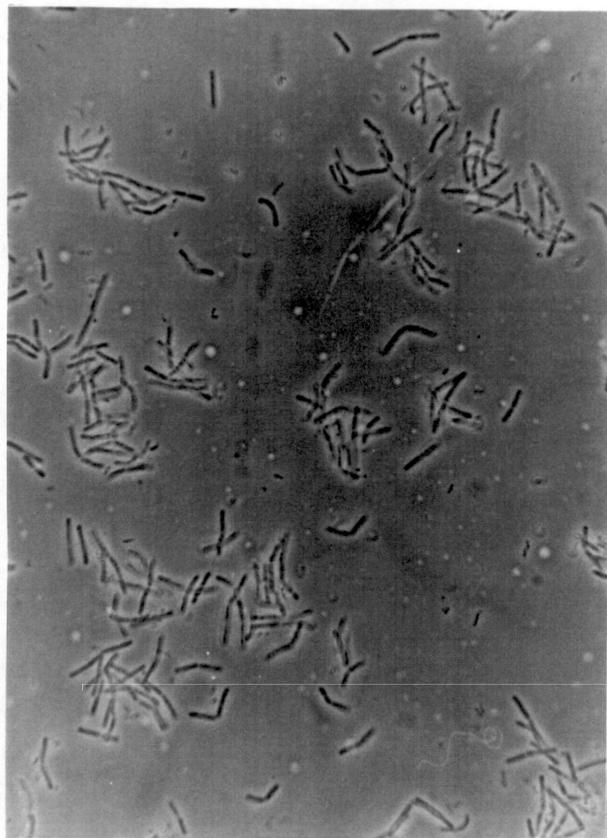
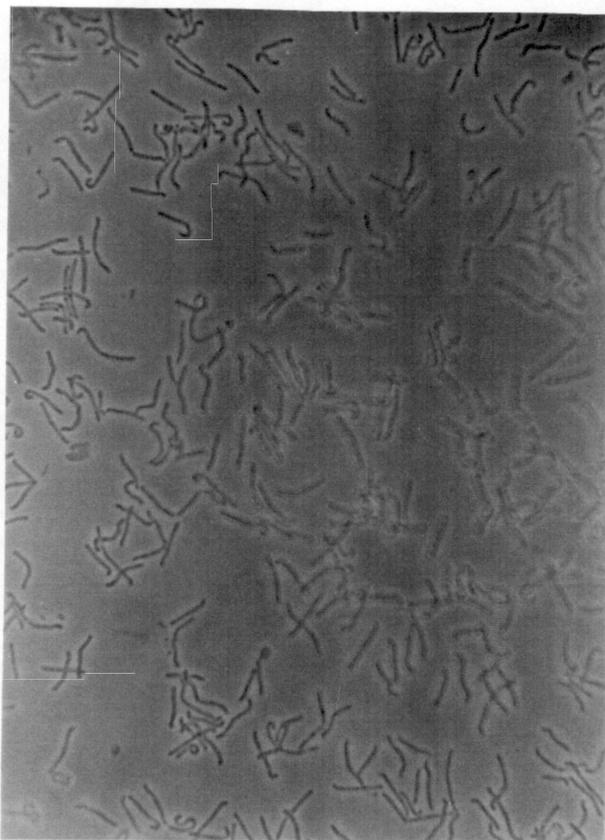


---

**Figura 3.4.** Efecto de las altas concentraciones de nutrientes (Medio X15) sobre la morfología de células de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

**a:** Células cultivadas en Medio X1 (testigo); **b:** Células cultivadas en Medio X15.  
Tiempo de cultivo: 96 horas. Aumento: 1000×

---

**a****b**

### 3.4.2. ENSAYOS DE DILUCION

Es posible que las altas concentraciones de nutrientes impliquen la existencia de altas concentraciones de algún compuesto capaz de suprimir o inhibir la esporulación del bacilo. Para verificar esta hipótesis el cultivo de 96 horas fue diluido con agua destilada, retirando del reactor volúmenes del medio de cultivo y agregando, en un frasco erlenmeyer estéril, la cantidad de agua destilada necesaria para obtener diluciones 1:2, 1:5 y 1:10 del caldo concentrado. El volumen total fue de 100 ml, y los frascos fueron incubados en las condiciones habituales. El control, mediante observación microscópica, permitió registrar los cambios producidos en las células, confrontando con un frasco testigo donde fueron incubados 100 ml del medio de 96 horas, sin diluir. Luego de 4 horas de incubación se pudo observar que las células, en todos los frascos (excepción hecha del testigo), habían perdido las inclusiones refringentes; a 24 horas de incubación pudo observarse un gran número de esporos y cristales. El recuento en el medio X15 no diluido fue de  $2 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>, mientras que, al diluir los cultivos 10 veces, se alcanzó un recuento de  $2 \times 10^9$  UFC.ml<sup>-1</sup>, valor muy cercano al esperado según estimaciones preliminares, es decir que los recuentos fueron alrededor de 15 veces mayores que los alcanzados en el Medio X1.

### 3.5. CONCLUSIONES

- *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crece en el Medio X1 en cultivos en tanque agitado; no hay inhibiciones y los valores de algunos de los parámetros de crecimiento son coincidentes con los reportados en bibliografía, tanto para esta variedad como para otras variedades. Otros, por el contrario, difieren de modo muy marcado, aunque algunos casos no pueden ser comparados de modo directo pues existen variaciones en las condiciones de cultivo.
- El Medio X7 permite un buen crecimiento del microorganismo, a pesar de cierta inhibición evidenciada por valores de velocidad específica de crecimiento menores que los observados en el Medio X1. Los recuentos de esporos son comparables con los encontrados en la literatura para otras variedades de *Bacillus thuringiensis*.

- Los ensayos con el Medio X15 dan resultados no satisfactorios: bajos valores de velocidad específica de crecimiento, células deformadas, esporulación suprimida y nula producción de  $\delta$ -endotoxina.
- Los resultados obtenidos en los cultivos con el Medios X15 pudieron revertirse mediante la dilución de los medios con agua destilada estéril. Esto indica que la supresión de la esporulación y de la formación de cristales es reversible.

# 4

---

## **Cultivos de *Bacillus thuringiensis* bajo distintas condiciones de aireación**

---

#### 4.1. INTRODUCCION.

Los estudios acerca de la variación del comportamiento de *Bacillus thuringiensis* con la composición del medio de cultivo han mostrado dramáticos efectos, tanto cualitativos (ver Capítulos 2 y 3) como cuantitativos (Smith 1982; Faloci *et al.* 1990). Una variable importante a tener en cuenta en los procesos de producción de este microorganismo es la aireación. *Bacillus thuringiensis* es un bacilo aerobio, y varios autores han reconocido la necesidad de altas velocidades de aireación para su producción (Scherrer *et al.* 1973; Moraes *et al.* 1980; Foda *et al.* 1985; Arcas 1985), pero algunos de ellos sólo presentan trabajos en frascos agitados, e inclusive carecen de información acerca de la relación del nivel de aireación con la producción de  $\delta$ -endotoxina. Arcas (1985) relaciona la esporulación de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* con el coeficiente de transferencia de oxígeno, y, al igual que Foda *et al.* (1985) con *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*, encuentra que una disminución en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno,  $k_L a$ , implica una disminución en el porcentaje de esporulación. Una patente otorgada a Zamola y Kajfez (1977) propone un proceso con aireación interrumpida, alternando períodos de aireación con períodos estancos, para la eficiente producción de *Bacillus thuringiensis*. Pearson y Ward (1988) sostienen que altos niveles de aireación promueven mayor crecimiento, esporulación y producción de  $\delta$ -endotoxina, pero no apoyan esta afirmación con datos cuantitativos.

No es posible encontrar mayor información acerca de los requerimientos de oxígeno de este microorganismo, aunque sí existe vasta bibliografía referida a la fisiología y al metabolismo de otros microorganismos relacionados, en mayor o menor grado, con *Bacillus thuringiensis*; tales los casos de *Bacillus cereus* (Hanson *et al.* 1963; Murrel 1967), *Bacillus polymyxa* (Kuratsu e Inuzuka 1984), *Bacillus larvae* (St. Julian y Bulla 1971; Dingman y Stahly 1983; 1984) y *Bacillus sphaericus* (Yousten y Wallis 1987). Debido a cierta similitud entre el metabolismo de estos microorganismos con el de *Bacillus thuringiensis*, es posible comparar comportamientos entre ellos, en particular con *Bacillus cereus*.

## 4.2. ASPECTOS FISIOLÓGICOS.

Entre los miembros del género *Bacillus*, la esporulación es acompañada por profundos cambios metabólicos. Cuando la fuente de carbono es glucosa, es posible observar una conversión de ésta en ácidos orgánicos, tales como fórmico, acético y pirúvico, con el consecuente descenso en el pH del medio, el cual, de ser muy pronunciado ( $\text{pH} < 5$ ), puede afectar la esporulación hasta el punto de llegar a suprimirla.

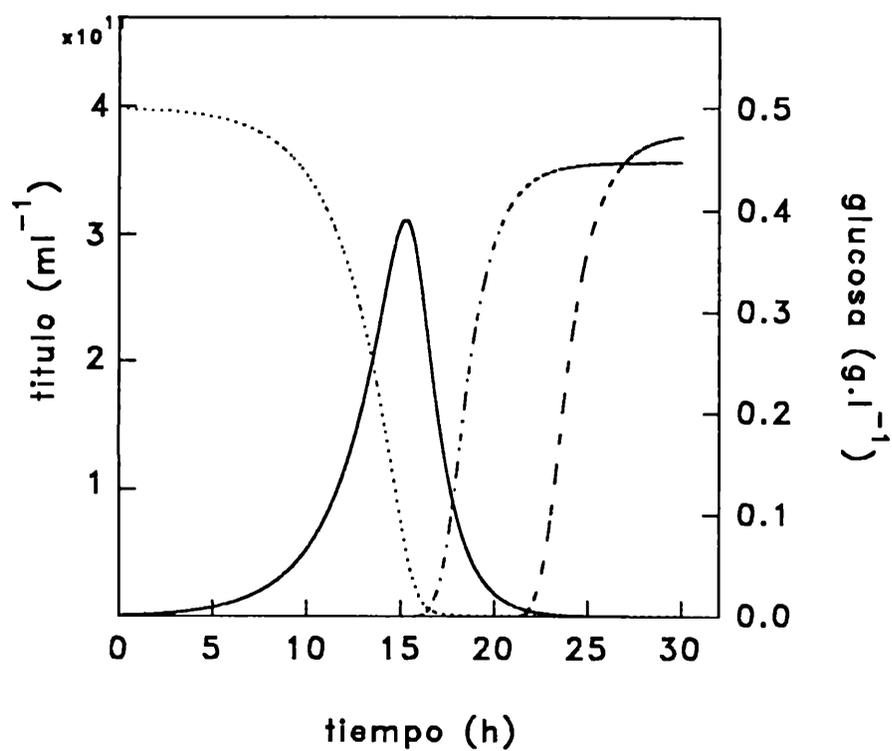
En *Bacillus cereus*, alrededor del 60% del carbono presente en la glucosa llega a encontrarse, al final de la fase exponencial, en el ácido acético, el cual es convertido *a posteriori* en ácido pirúvico (Murrell 1967). Una vez que la fuente de carbono ha sido consumida en su totalidad, termina la fase de crecimiento exponencial y comienza la esporulación (Figura 4.1). En esta etapa, los ácidos acético y pirúvico formados, esenciales para la esporulación (Hanson *et al.* 1963), son consumidos, con lo que el pH del medio vuelve a aumentar.

Durante el crecimiento vegetativo, los carbohidratos son metabolizados por la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (y, en menor extensión, la ruta de las pentosas fosfato). Los ácidos formados son luego oxidados por las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos modificado, cuya represión cesa al comenzar la esporulación. *Bacillus thuringiensis* no presenta actividad  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa, por lo que se ha propuesto la existencia de un ciclo de los ácidos tricarboxílicos incompleto (Nickerson *et al.* 1974; Aronson *et al.* 1975), donde la existencia de la ruta del ácido  $\gamma$ -aminobutírico permite la conversión de glutamato en succinato.

### 4.2.1. EL ROL DEL OXÍGENO EN EL METABOLISMO DE *BACILLUS*

En *Bacillus cereus* se observa que la curva de demanda de oxígeno presenta un mínimo coincidente con el mínimo de la curva de pH. Luego la demanda de oxígeno vuelve a aumentar, al mismo tiempo que el aumento en el pH. Este aumento en la demanda de oxígeno se atribuye a un aumento en la demanda por célula,  $q_{O_2}$ . Este comportamiento también es observado en otras especies de *Bacillus* (*subtilis*, *coagulans*, *megaterium*), tal como se informa en la bibliografía antes citada.

**Figura 4.1.** Secuencia de eventos que puede observarse en un cultivo batch de *Bacillus thuringiensis*. — células vegetativas; ··· concentración de glucosa; ·-·-· producción de  $\delta$ -endotoxina; - - - formación de esporos (Adaptado de Schulz *et al.* 1985).



El suministro de oxígeno es esencial para la esporulación en *Bacillus*, tal vez para lograr la oxidación de los ácidos orgánicos acumulados durante la primera etapa del crecimiento y, en consecuencia, obtener energía. *Bacillus megaterium* presenta lisis e insuficiente esporulación cuando se cultiva en medios con bajos niveles de aireación; si la aireación es mayor, es posible observar un aumento en el consumo de oxígeno antes de la aparición de formas esporuladas (Dingman y Stahly 1983).

Como se mencionó antes, *Bacillus cereus* muestra dos picos de demanda de oxígeno, uno paralelo al aumento de la población celular y el otro acompañando al aumento de pH, cuando desaparece el acetato acumulado en el medio. La necesidad de altos niveles de aireación puede depender de la cantidad de ácidos orgánicos presentes en el medio: a mayor concentración de glucosa inicial, mayor será el requerimiento de oxígeno. Según Hanson *et al.* (1963), el ácido acético formado es tanto oxidado a dióxido de carbono (vía ciclo de los ácidos tricarbónicos) como convertido en ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico durante las etapas iniciales de la esporulación. Estos autores postulan que las reacciones que proveen energía durante el crecimiento difieren de aquellas que generan energía durante la esporulación. Durante el crecimiento vegetativo es consumida cerca del 95% de la glucosa, mientras que el acetato es consumido durante la esporulación, transformándose en la mayor fuente de energía de dicha etapa.

Un comportamiento similar ha sido descrito para *Bacillus larvae* (St. Julian y Bulla 1971). Este microorganismo, a diferencia de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*, es fastidioso; presenta baja capacidad de esporulación en medios artificiales, y requiere velocidades de aireación más bajas que otras especies de *Bacillus* (Dingman y Stahly 1983).

Entre los trabajos relacionados con la producción de microorganismos patógenos para larvas de insectos, se puede citar el de Yousten y Wallis (1987), en el que se analiza la producción de *Bacillus sphaericus*, microorganismo que, al igual que *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, es tóxico contra larvas de mosquito. Para *Bacillus sphaericus* se encuentra que la síntesis de la toxina y la esporulación requieren oxígeno; sin embargo, el suministro de oxígeno puro provoca una disminución de cerca del 70% de la toxicidad, sin poder adjudicarse este efecto a una inhibición de la síntesis de la toxina o a una desnaturalización de la misma debida al alto nivel de oxígeno disuelto en el medio.

Es conocida la necesidad de altas velocidades de aireación para *Bacillus thuringiensis* (Holmberg *et al.* 1980; Foda *et al.* 1985), e inclusive ha sido estudiado el efecto del oxígeno disuelto sobre la velocidad de respiración y sobre el crecimiento (Moraes *et al.* 1980); para la variedad *israelensis* se ha encontrado que altos niveles de aireación aceleran la esporulación, pero no se informan datos cuantitativos, y en ningún caso ha sido establecida la relación entre la producción de  $\delta$ -endotoxina y el nivel de aireación.

El objetivo de esta etapa es la determinación de los requerimientos de oxígeno de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, y de parámetros, tales como los rendimientos en biomasa, en toxina y en esporos, que permitan evaluar el crecimiento del microorganismo cultivado bajo diferentes condiciones de aireación.

### 4.3. MATERIALES Y METODOS

4.3.1. MICROORGANISMO. El microorganismo empleado fue la cepa 1882 de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, serotipo H-14, tal como se mencionara en la Sección 2.3.1.

4.3.2. INOCULOS. Los inóculos se preparan resuspendiendo, con agua destilada estéril, el crecimiento de los tubos de agar de mantenimiento (ver 2.3.3.).

4.3.3. MEDIO DE CULTIVO. La composición del medio de cultivo empleado en estos ensayos fue (g.l<sup>-1</sup>): glucosa, 7; extracto de levadura, 1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.47; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.08; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.05; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5. El pH se ajusta a 6.8 antes de esterilizar. Los componentes del medio se esterilizan, por separado, en autoclave, a 121 °C durante 15 minutos. La esterilización es realizada por separado (glucosa; extracto de levadura-sulfato de amonio; sales; fosfatos) para evitar interacciones no deseadas.

4.3.4. CONDICIONES DE CULTIVO. Los experimentos se realizaron en biorreactores de 6 litros de capacidad, con un volumen de trabajo de 4 l. La temperatura fue 30 °C, y la velocidad de aireación 2 l.min<sup>-1</sup> (0.5 vvm). Cada cultivo tuvo una duración de 48 h, con el fin de asegurar lisis total de las células. Las velocidades de transferencia de oxígeno estudiadas fueron obtenidas operando los reactores bajo distintas condiciones de agitación.

4.3.5. DETERMINACIONES ANALITICAS. Las concentraciones de biomasa y de  $\delta$ -endotoxina, los recuentos de esporos, y las concentraciones de nitrógeno total, de amonio y de glucosa fueron determinadas tal como se describiera en el Capítulo 2 (Sección 2.3.5.1. y siguientes).

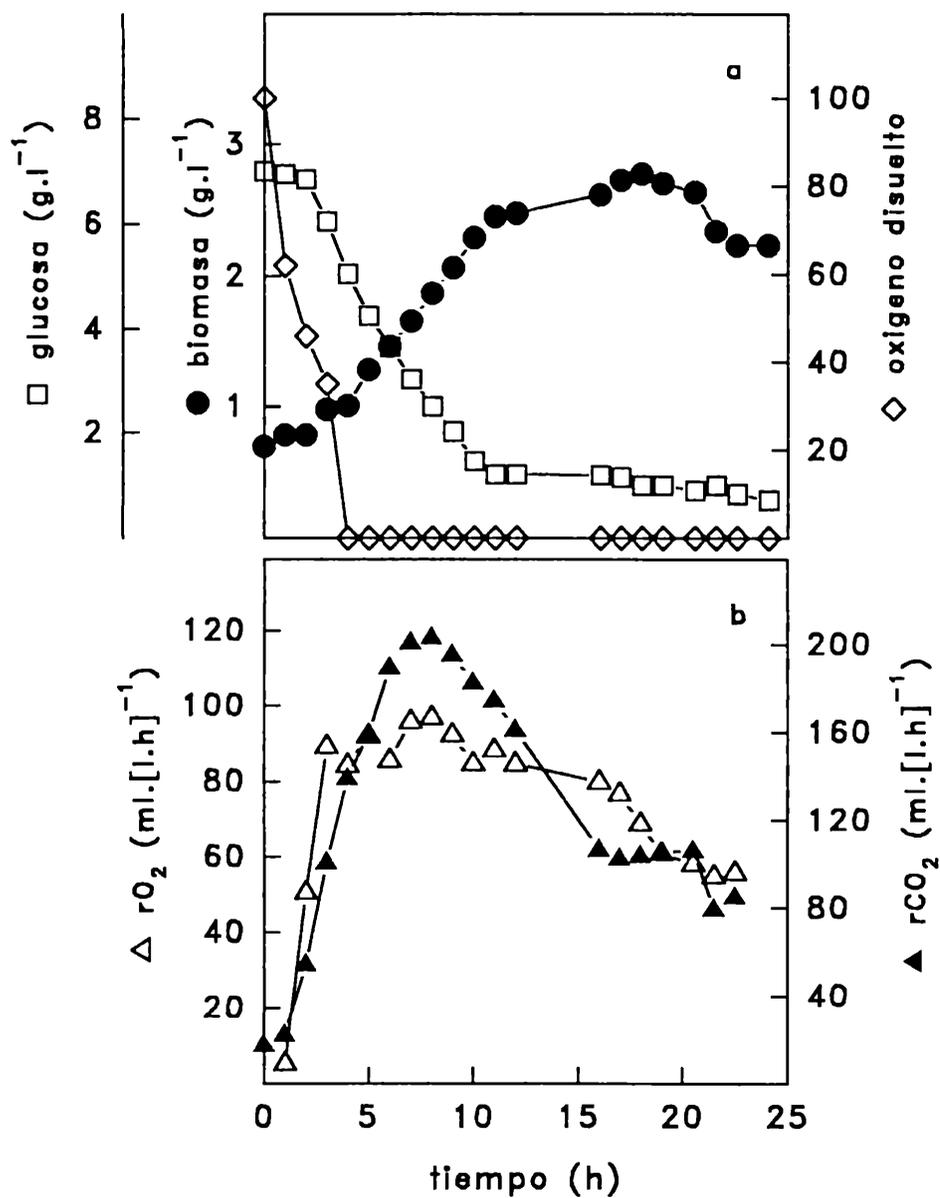
4.3.5.1. OXIGENO DISUELTO. El oxígeno disuelto en el medio de cultivo se midió de modo permanente empleando un electrodo de oxígeno esterilizable, tal como fuera descrito en el Capítulo 3 (Sección 3.3.1.6.)

4.3.5.2. COMPOSICION DEL GAS EFLUENTE DEL BIORREACTOR. Las concentraciones de oxígeno y de dióxido de carbono en los gases de salida del fermentador fueron determinadas con sendos detectores de oxígeno (Beckman OM-14 Oxygen Analyzer) y de dióxido de carbono (Horiba PIR 2000). Las velocidades de consumo de oxígeno ( $rO_2$ ) y de producción de dióxido de carbono ( $rCO_2$ ) fueron calculadas mediante balances en fase gaseosa. El consumo total de oxígeno fue estimado por integración de la curva  $rO_2$  vs tiempo.

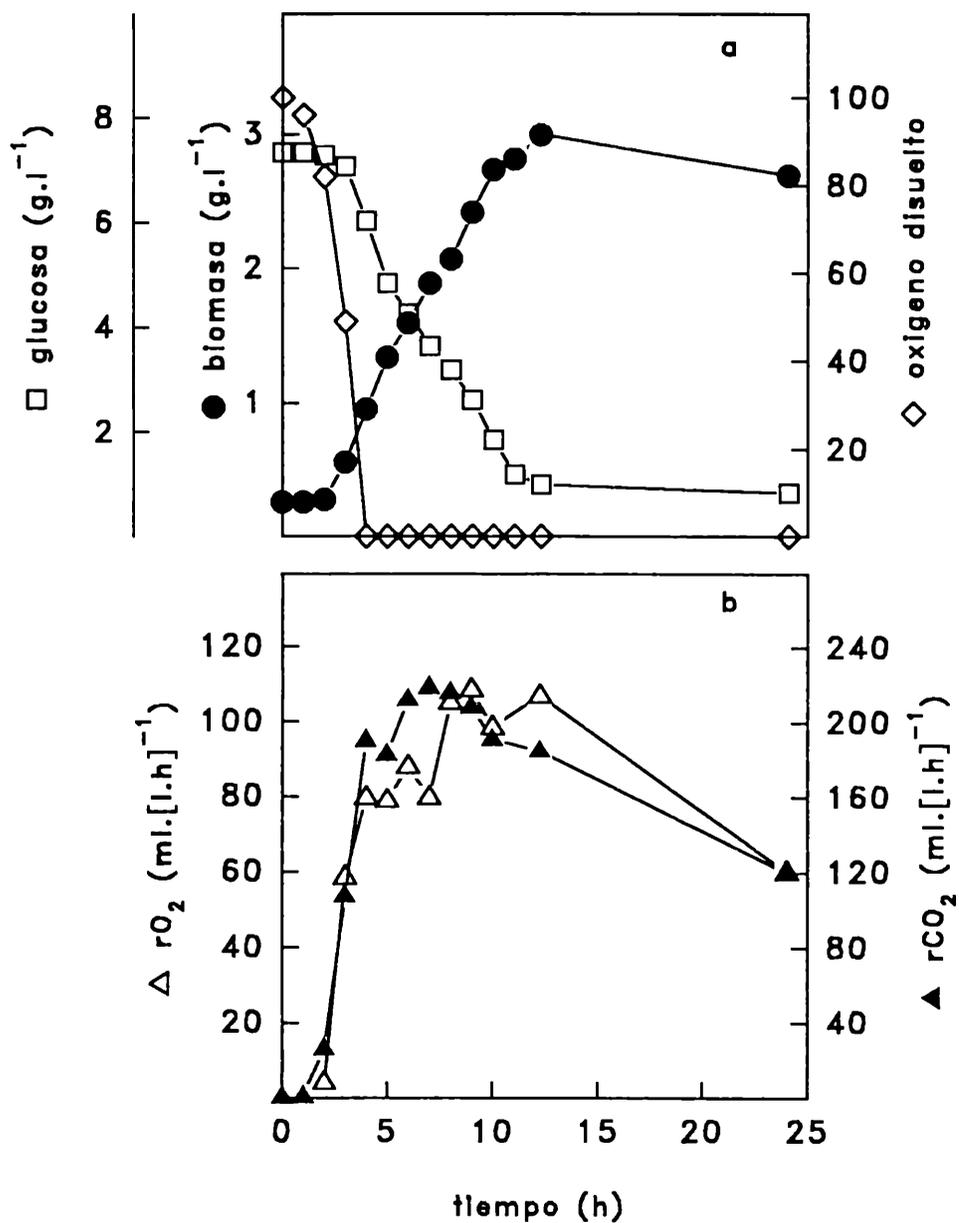
#### 4.4. RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados de cultivos realizados bajo siete valores de transferencia máxima de oxígeno se presentan en las curvas de las Figuras 4.2 a 4.7. En ellas se han representado las variaciones de la concentración de biomasa y de oxígeno disuelto, y las velocidades de consumo de oxígeno y de producción de dióxido de carbono en el tiempo. En los ensayos 1 y 2, el nivel de oxígeno disuelto llegó a cero a partir de las 4 h de cultivo, con lo cual los cultivos permanecieron limitados por oxígeno. Esto promueve un crecimiento lineal de la concentración de biomasa, lo que puede ser verificado en las curvas de variación de biomasa con el tiempo. El experimento 3 muestra que el nivel de oxígeno disuelto se hace cero a las 5 h de cultivo, y de inmediato comienza a aumentar. En las experiencias 4, 5 y 6 el nivel de oxígeno disuelto se mantuvo, durante todo el cultivo, en valores superiores al 50% de la saturación.

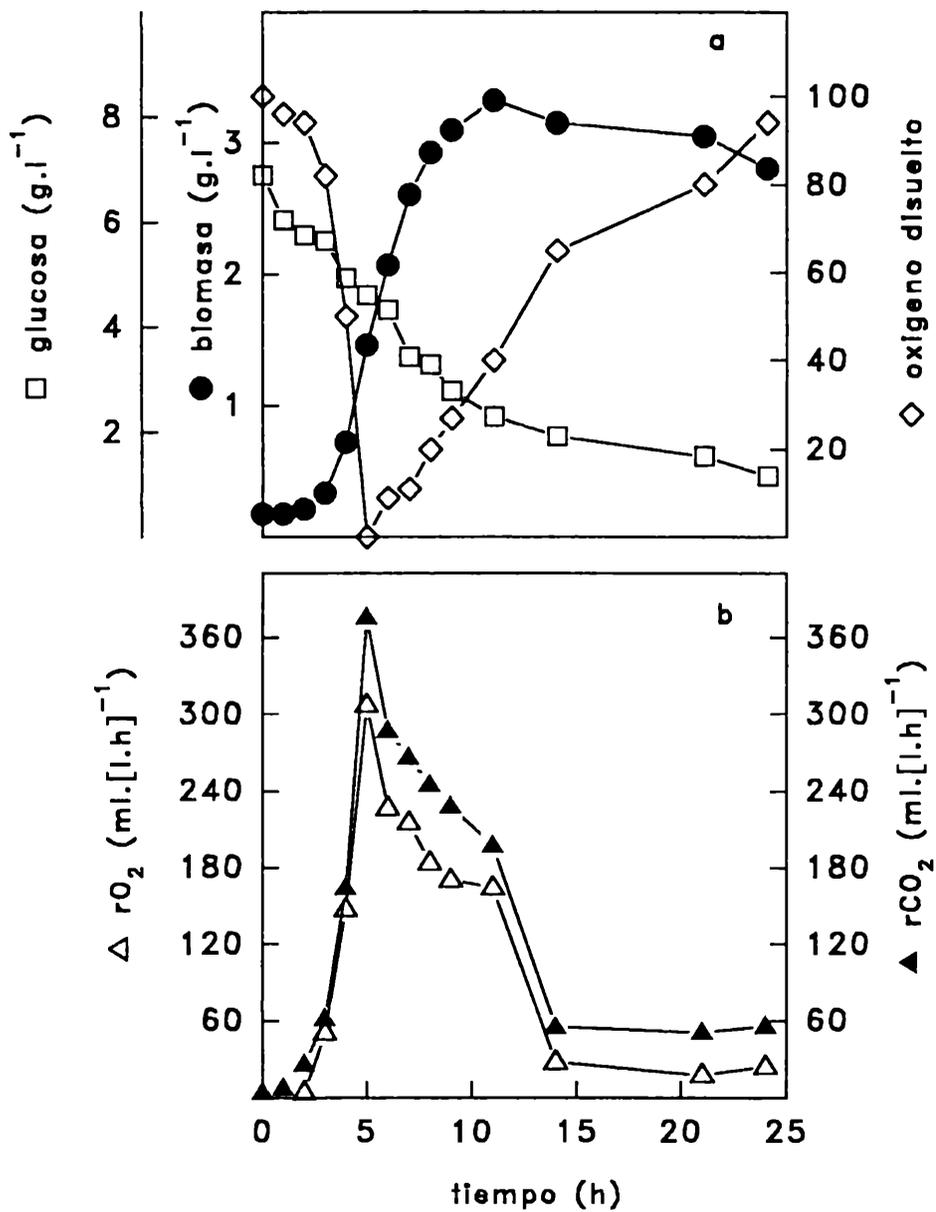
**Figura 4.2.** Experimento 1: cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* con limitación por oxígeno. Velocidad máxima de transferencia de oxígeno:  $3.1 \text{ mmol O}_2 \cdot (\text{l}\cdot\text{h})^{-1}$ . **a.** Curvas de crecimiento, de consumo de glucosa y de oxígeno disuelto **b.** Consumo de oxígeno ( $rO_2$ ) y producción de dióxido de carbono ( $rCO_2$ ).



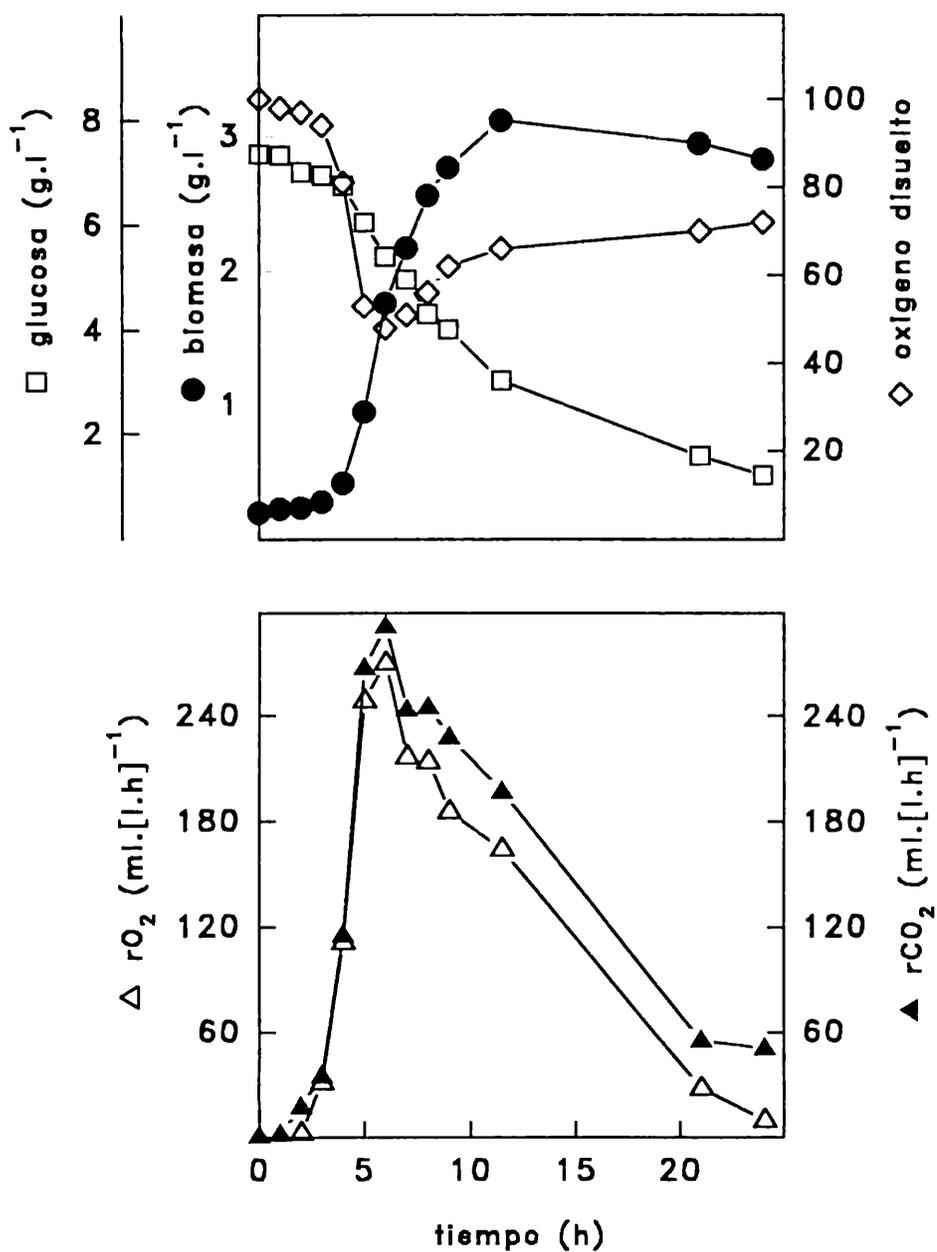
**Figura 4.3.** Experimento 2: cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* con limitación por oxígeno. Velocidad máxima de transferencia de oxígeno:  $7.2 \text{ mmol O}_2 \cdot (\text{l} \cdot \text{h})^{-1}$ . **a.** Curvas de crecimiento, de consumo de glucosa y de oxígeno disuelto **b.** Consumo de oxígeno ( $rO_2$ ) y producción de dióxido de carbono ( $rCO_2$ ).



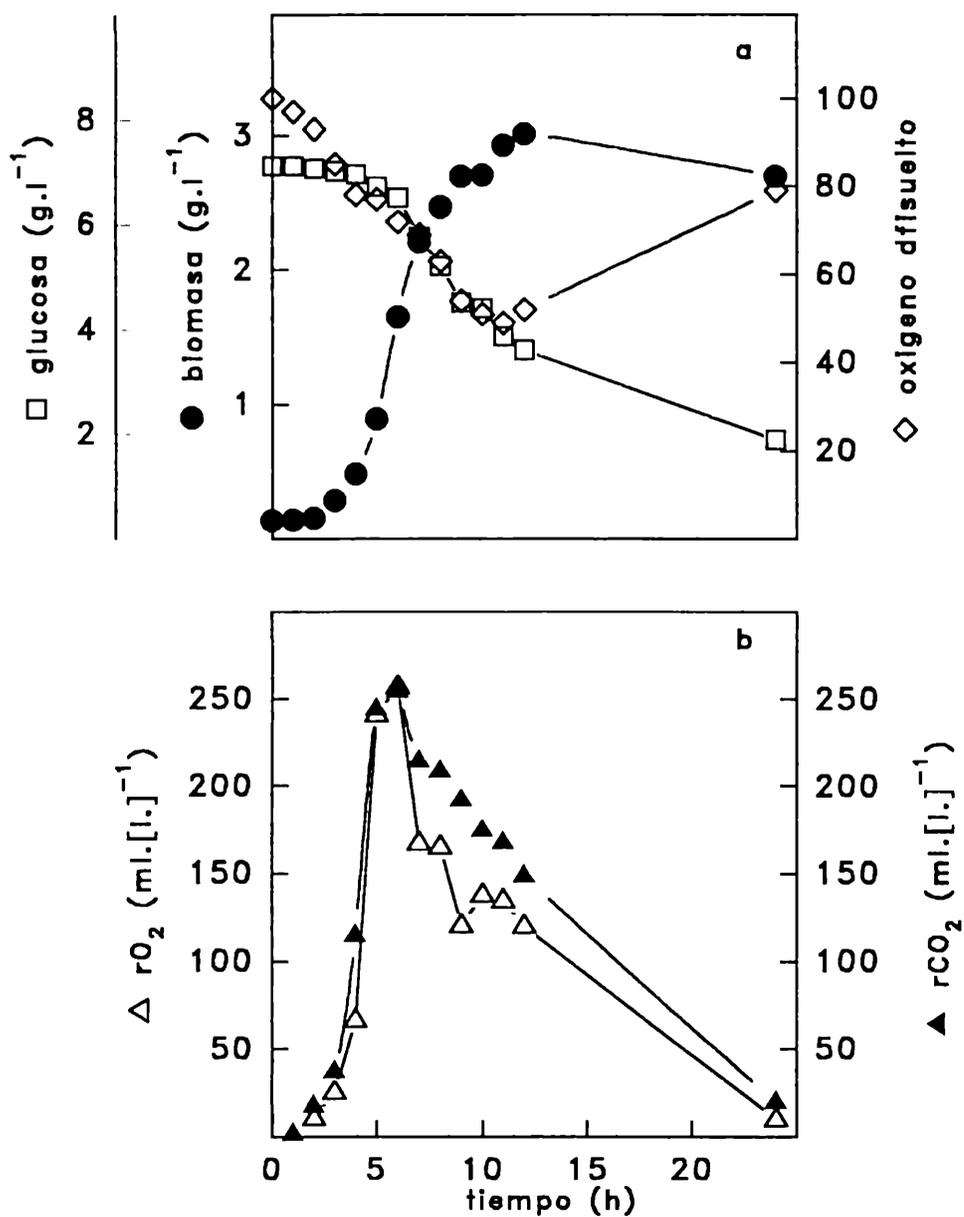
**Figura 4.4.** Experimento 3: cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sin limitación por oxígeno. Velocidad máxima de transferencia de oxígeno:  $14.9 \text{ mmol O}_2 \cdot (\text{l}\cdot\text{h})^{-1}$ . **a.** Curvas de crecimiento, de consumo de glucosa y de oxígeno disuelto **b.** Consumo de oxígeno ( $rO_2$ ) y producción de dióxido de carbono ( $rCO_2$ ).



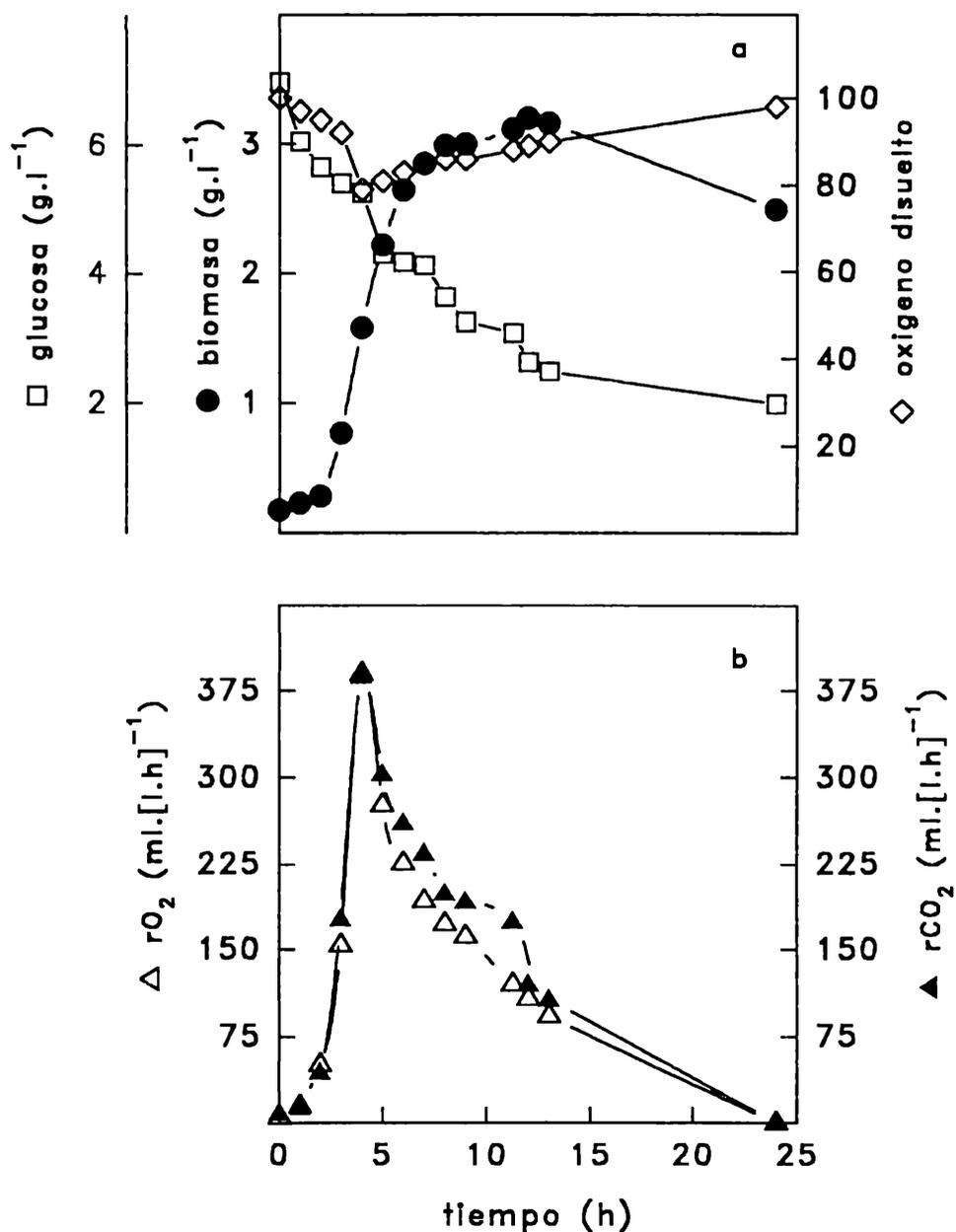
**Figura 4.5.** Experimento 4: cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sin limitación por oxígeno. Velocidad máxima de transferencia de oxígeno:  $23.4 \text{ mmol O}_2 \cdot (\text{l.h})^{-1}$ . **a.** Curvas de crecimiento, de consumo de glucosa y de oxígeno disuelto **b.** Consumo de oxígeno ( $r_{O_2}$ ) y producción de dióxido de carbono ( $r_{CO_2}$ ).



**Figura 4.6.** Experimento 5: cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sin limitación por oxígeno. Velocidad máxima de transferencia de oxígeno:  $34.2 \text{ mmol O}_2 \cdot (\text{l} \cdot \text{h})^{-1}$ . **a.** Curvas de crecimiento, de consumo de glucosa y de oxígeno disuelto **b.** Consumo de oxígeno ( $rO_2$ ) y producción de dióxido de carbono ( $rCO_2$ ).



**Figura 4.7.** Experimento 6: cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sin limitación por oxígeno. Velocidad máxima de transferencia de oxígeno:  $48.4 \text{ mmol O}_2 \cdot (\text{l.h})^{-1}$ . **a.** Curvas de crecimiento, de consumo de glucosa y de oxígeno disuelto **b.** Consumo de oxígeno ( $rO_2$ ) y producción de dióxido de carbono ( $rCO_2$ ).



## 4.4.1. PARAMETROS DE CRECIMIENTO.

En cuanto a los parámetros de crecimiento, pueden verse dos comportamientos bien diferenciados. Los resultados (Tabla 4.1) muestran que las condiciones de aireación y de agitación bajo las que se realiza el cultivo afectan de modo drástico el nivel de esporulación y de síntesis de  $\delta$ -endotoxina.

**Tabla 4.1.** Resultados obtenidos en cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* realizados bajo distintas condiciones de aireación y agitación.

| Exp | CONDICION    | RPM  | VTO<br>max | $\delta$ -endotoxina | Rto | PS   | $Y_{x/s}$ | $Y_{x/o}$ | $Y_{p/x}$ | $qO_2$ |
|-----|--------------|------|------------|----------------------|-----|------|-----------|-----------|-----------|--------|
| 1   | LIMITACION   | 150  | 3.1        | 239                  | 39  | 2.45 | 0.39      | 2.48      | 0.089     | 0.099  |
| 2   |              | 250  | 7.2        | 278                  | 45  | 2.78 | 0.40      | 2.41      | 0.090     | 0.100  |
| 3   | NO           | 350  | 14.9       | 415                  | 81  | 3.30 | 0.62      | 1.41      | 0.126     | 0.495  |
| 4   | LIMITACION   | 450  | 23.4       | 410                  | 91  | 3.12 | 0.68      | 1.47      | 0.131     | 0.501  |
| 5   |              | 550  | 34.2       | 390                  | 85  | 3.19 | 0.67      | 1.51      | 0.122     | 0.503  |
| 6   |              | 650  | 48.4       | 390                  | 85  | 3.20 | 0.67      | 1.41      | 0.122     | 0.498  |
| 7   | AIREACION    | 350* | 14.9       | 280                  | 79  | 3.30 |           |           | 0.085     | --     |
| 8   | INTERRUMPIDA | 350# | 14.9       | --                   | 1   | 1.50 |           |           | --        | --     |

\*Aireación interrumpida cuando se alcanza la máxima concentración de biomasa; #Aireación interrumpida cuando se alcanza  $O_2$  disuelto = 0. RPM: velocidad de agitación en  $\text{rev}\cdot\text{min}^{-1}$  VTO: velocidad de transferencia de oxígeno máxima [ $\text{mmol } O_2\cdot(\text{l}\cdot\text{h})^{-1}$ ].  $\delta$ -endotoxina: concentración final ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Rto: recuento de unidades formadoras de colonias  $\times 10^7$  UFC. $\text{ml}^{-1}$ . PS: máxima concentración de biomasa alcanzada ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ).  $qO_2$ : velocidad específica de consumo de oxígeno ( $\text{g } O_2\cdot[\text{g biomasa}\cdot\text{h}]^{-1}$ )

$Y_{x/s}$ : rendimiento en base a glucosa [ $\text{g biomasa formados}\cdot(\text{g de sustrato consumido})^{-1}$ ].  $Y_{x/o}$ : rendimiento en base a oxígeno [ $\text{g de biomasa formados}\cdot(\text{g de oxígeno consumido})^{-1}$ ].  $Y_{p/x}$ : g de  $\delta$ -endotoxina formada.(g de biomasa máxima) $^{-1}$ .

En los experimentos realizados en condiciones de limitación se obtuvieron valores de biomasa y de  $\delta$ -endotoxina iguales a  $239 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $2.78 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (Experimento 1) y de  $278 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $2.84 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (Experimento 2), los cuales son inferiores, con elevado grado de significación ( $P < 0.01$ ), a los obtenidos en los Experimentos 3, 4, 5 y 6 (Tabla 4.1). Ogarkov *et al.* (1989) describen células deformadas, lisis y desincronización de los cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *dendrolimus* en condiciones de deficiente aireación, pero estos fenómenos no se observan en los ensayos aquí descritos.

En los cultivos 3 a 6 (velocidades de transferencia de oxígeno máximas entre 14.9 y 48.4 mol.[l.h]<sup>-1</sup>) se encuentra que las concentraciones máximas de biomasa fueron alcanzadas a un tiempo de cultivo cercano a 12 h, tiempo al cual la esporulación ya ha comenzado. Los rendimientos basados en glucosa,  $Y_{x/s}$ , muestran diferencias no significativas entre sí (Tabla 4.1), presentando un valor promedio de 0.66 g biomasa.(g glucosa consumido)<sup>-1</sup>; este valor, algo elevado, es típico de cultivos batch de *Bacillus thuringiensis* en medios con glucosa y extracto de levadura. Es probable que el microorganismo utilice algunos restos carbonados presentes en el extracto de levadura como fuente de carbono. En cultivos limitados en oxígeno, sin embargo, el valor de  $Y_{x/s}$  es muy inferior (0.44 g.g<sup>-1</sup>). Esto contrasta con los valores de rendimientos informados por Moon y Parulekar (1991) para cultivos de *Bacillus firmus*, de cuyos datos pueden extraerse valores de  $Y_{x/s}$  que no presentan grandes diferencias entre cultivos limitados y no limitados en oxígeno.

Medrano-Roldán *et al.* (1993) encuentran, para *Bacillus thuringiensis* var. *kumamotoensis*, una muy baja demanda de oxígeno (0.70 g.[l.h]<sup>-1</sup>), comparada con las que se presentan en literatura (1.2 - 1.8 g.[l.h]<sup>-1</sup>) para otras variedades. Bajo distintas condiciones de agitación (200 - 800 rev.min<sup>-1</sup>) encuentran valores de  $Y_{x/s}$  entre 0.45 y 0.50 g.g<sup>-1</sup>, valores de  $\mu_{max}$  entre 0.2 y 0.3 h<sup>-1</sup> y demandas específicas de oxígeno ( $q_{O_2}$ ) entre 0.21 y 0.29 g.(g.h)<sup>-1</sup>. No se informan toxicidad ni concentración de  $\delta$ -endotoxina, ni se indica la existencia de limitaciones por oxígeno.

Moraes *et al.* (1980) proponen, para *Bacillus thuringiensis* NCIB 9207, una inhibición por oxígeno en la velocidad específica de consumo de oxígeno  $q_{O_2}$ : luego de alcanzar un valor crítico de oxígeno disuelto, se observa una disminución en  $q_{O_2}$  debida, según se propone, a un efecto inhibitorio causado por el oxígeno.

La evaluación del oxígeno total consumido desde el comienzo de la fermentación hasta el momento en que se alcanza la máxima biomasa permite el cálculo de los rendimientos de biomasa basados en oxígeno,  $Y_{x/o}$ . Otra vez se encuentran diferencias significativas entre los cultivos limitados y los no limitados (Tabla 4.1). Los cultivos no limitados presentan un valor promedio de  $Y_{x/o} = 1.45$  g.g<sup>-1</sup>, mientras que en los cultivos limitados este valor asciende a 2.45 g.g<sup>-1</sup>. Los valores de  $Y_{x/o}$  obtenidos sugieren que *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, cultivado en condiciones de limitación por oxígeno, presenta una mayor eficiencia en el consumo de oxígeno. Esto puede compararse con los resultados de Harrison y Pirt (1967) para *Klebsiella aerogenes* y con los de Rizzi *et al.* (1989) para *Pichia*

*stipitis*. En este último caso, la levadura presenta, bajo condiciones de limitación por oxígeno, un valor de  $Y_{x/o}$  tres veces mayor que el valor de  $Y_{x/o}$  en condiciones aeróbicas. Recordando (Capítulo 3) la relación existente entre  $Y_{x/o}$  e  $Y_{x/ATP}$ ,

$$Y_{x/o} = 2(P:O) \cdot Y_{x/ATP}$$

puede postularse que la limitación en el suministro de oxígeno provoca un acoplamiento más estrecho entre el crecimiento y la producción de energía (Neijssel y Tempest 1976).

A partir de los datos informados por Moraes *et al.* (1980) se puede estimar un valor de  $Y_{x/o}$  de 1.28 g.g<sup>-1</sup>, muy similar al alcanzado en los experimentos 3 a 6, no limitados en oxígeno. Sin embargo, Holmberg *et al.* (1980) no encuentran diferencias en los  $Y_{x/o}$  calculados bajo diferentes condiciones de aireación; de todos modos, en ese trabajo no hay evidencias fehacientes que permitan afirmar que los cultivos estuvieran limitados en oxígeno.

#### 4.4.2. ESPORULACION.

Los cultivos limitados por oxígeno presentaron recuentos de alrededor de 4 x 10<sup>8</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>, mientras que en los experimentos realizados bajo condiciones de no limitación los recuentos fueron de alrededor de 9 x 10<sup>8</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>. Estas tendencias coinciden con las encontradas por Foda *et al.* (1985), quienes, realizando experimentos en frascos agitados, encontraron que cuanto mayor es el volumen de medio en los frascos (esto es, menor transferencia de oxígeno), menor es el recuento de esporos alcanzado.

Dingman y Stahly (1984) indican que el oxígeno es esencial para la esporulación en la mayoría de las especies del género *Bacillus*. Bajo condiciones de anaerobiosis, por ejemplo, *Bacillus larvae* no esporula, y es necesario mantener la aireación en un nivel adecuado para la esporulación de este bacilo. Condiciones de aireación vigorosa, típicas de cultivos de otros bacilos, no tiene efectos deletéreos sobre la velocidad de crecimiento vegetativo, pero suprimen la esporulación (Dingman y Stahly 1983). Estos autores proponen que *Bacillus larvae* presenta esporulación de naturaleza microaerofílica, pues no tiene la capacidad de descomponer peróxido de hidrógeno, compuesto que se forma durante la

esporulación temprana. Esta observación fue hecha también para *Bacillus popilliae* (Pepper y Costilow 1965).

Muchas especies de *Bacillus* presentan una cadena de transporte de electrones ramificada; una rama es usada con preferencia durante el crecimiento exponencial y la otra durante la esporulación. *Bacillus popilliae* presenta dos cadenas: sólo la que funciona durante la esporulación es capaz de producir peróxido de hidrógeno (Pepper y Costilow 1965). Este microorganismo (patógeno por invasión de la larva hospedante) presenta una marcada sensibilidad al oxígeno y son necesarias condiciones de anaerobiosis para obtener buen crecimiento e infectividad. Se ha propuesto (Travers *et al.* 1982) que *Bacillus popilliae* es un anaerobio aerotolerante.

Yousten y Wallis (1987), trabajando con la cepa 2362 de *Bacillus sphaericus*, demuestran el efecto del oxígeno sobre la producción de la toxina y la esporulación. En cultivos no limitados el recuento de esporos ( $7.2 \times 10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup>) difiere de modo muy marcado respecto de condiciones de limitación por oxígeno ( $2.1 \times 10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup>). Cuando la aireación se realiza con oxígeno puro no se observa disminución de la esporulación ni del crecimiento. Una extensión del trabajo de Yousten y Wallis es el de Karim *et al.* (1993); en él se presentan datos acerca de la velocidad de esporulación de *Bacillus sphaericus* 2362, la cual disminuye al disminuir el nivel de oxígeno disuelto.

Cuando la demanda de oxígeno de *Bacillus licheniformis* (Schulp y Stouthamer 1970), creciendo con aireación débil en medios con nitrato, alcanza a exceder el suministro (nivel de oxígeno disuelto igual a cero), se observa la inducción de una nitrato reductasa, capaz de reducir nitrato a nitrito, verificándose una respiración simultánea de oxígeno y de nitrato. Si el cultivo se realiza en ausencia de nitrato, o si las fuentes de carbono fermentescibles se han agotado, la limitación por oxígeno induce la lisis celular. Idéntico comportamiento se observa en cultivos de *Bacillus subtilis* (Nomura 1975); la interrupción de la aireación provoca una rápida lisis (la así llamada *lisis anaeróbica*). También se observa lisis durante crecimiento aeróbico cuando se agota la fuente de energía, es decir cuando se interrumpe la generación de ATP. *B. subtilis* y *B. licheniformis* parecen estar sujetos a autólisis en ausencia de síntesis continua de componentes de la pared celular, mecanismo dependiente de ATP.

Según se dijo antes, la producción de energía durante la esporulación ocurre por medio de un ciclo de los ácidos tricarboxílicos modificado. Por otro lado, la presencia de glucosa en los medios reduce la respiración de otros sustratos (piruvato, succinato) y suprime la de acetato y citrato, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Pero en *Bacillus subtilis* la glucosa reprime de modo parcial a las enzimas de la primera parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, mientras que las enzimas de la segunda parte no se ven afectadas. Asimismo, Schaeffer (1952) indica que, en *Bacillus cereus*, el oxígeno induce las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. En *Bacillus thuringiensis* (Aronson *et al.* 1975) el ciclo de los ácidos tricarboxílicos está modificado a nivel de las enzimas de la segunda parte (no existe la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa), por lo que podría suponerse que el efecto de la limitación de oxígeno sobre la inducción de las enzimas del ciclo, junto a la posible represión de las enzimas de la primera parte del ciclo (debida a la glucosa), causarían la inhibición del mismo, disminuyendo la producción de energía durante la esporulación, y con ella el recuento de esporos.

En base a esta discusión puede proponerse que *Bacillus thuringiensis* presenta un mecanismo similar. La disminución en el recuento de esporos cuando se cultiva en condiciones de limitación de oxígeno coinciden con lo encontrado en otras especies de *Bacillus*.

#### 4.4.3. EL SUMINISTRO DE OXIGENO Y LA PRODUCCION DE $\delta$ -ENDOTOXINA.

En los cultivos limitados en oxígeno las concentraciones de  $\delta$ -endotoxina alcanzadas fueron bajas comparadas con las obtenidas en cultivos no limitados: 258 mg.l<sup>-1</sup> en cultivos limitados frente a 415 mg.l<sup>-1</sup> en cultivos no limitados. Esto representa una disminución cercana al 60 % respecto del máximo.

Abdel-Hameed *et al.* (1991) encuentran una disminución del 56 % en los rendimientos de  $\delta$ -endotoxina cuando se emplean bajas velocidades de agitación (es decir bajas transferencias de oxígeno) en cultivos en frascos agitados de una cepa de *Bacillus thuringiensis* H-14 aislada en Egipto. Mayores velocidades de agitación parecerían inhibir la producción de la toxina.

Yousten y Wallis (1987), trabajando con la cepa 2362 de *Bacillus sphaericus*, demuestran el efecto del oxígeno sobre la producción de la toxina. En

cultivos no limitados se obtiene un mayor título de toxina que en cultivos limitados en oxígeno. Cuando la aireación se realiza con oxígeno puro, los títulos disminuyen un 72 % respecto del nivel alcanzado en cultivos no limitados usando aire. En ese trabajo no se llega a determinar si hay inhibición de la síntesis o si el alto nivel de oxígeno disuelto es capaz de provocar daños en la proteína formada. Esta especulación es difícil de trasladar a lo observado en *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, debido a las marcadas diferencias entre las toxinas de uno y otro microorganismo.

#### 4.4.4. EXPERIMENTOS CON AIREACION INTERRUPTIDA.

Para analizar si la limitación por oxígeno afecta a la esporulación y a la síntesis de  $\delta$ -endotoxina desde las primeras etapas del crecimiento, se realizaron dos experimentos con aireación interrumpida. En uno de ellos (Experimento 7) la aireación fue interrumpida al alcanzarse la concentración máxima de biomasa. El cultivo fue iniciado en condiciones de no limitación ( $350 \text{ rev. min}^{-1}$ , VTO:  $14.9 \text{ mmol. [l.h]}^{-1}$ ), y la aireación se interrumpió a las 12 h de cultivo, cuando la concentración de biomasa era de  $3.30 \text{ g.l}^{-1}$ . Luego de 48 h, la concentración de  $\delta$ -endotoxina alcanzada ( $280 \text{ mg.l}^{-1}$ ) era igual a aquella alcanzada en cultivos limitados, pero el recuento de esporos ( $79 \times 10^8 \text{ UFC.ml}^{-1}$ ) fue igual al alcanzado en cultivos no limitados.

Las condiciones iniciales de aireación del Experimento 8 fueron iguales a las del Experimento 7, pero la aireación fue interrumpida cuando el nivel de oxígeno disuelto cayó a cero (alrededor de 5 h de cultivo). La concentración de biomasa alcanzada fue de  $1.5 \text{ g.l}^{-1}$ , el recuento final de  $1 \times 10^7 \text{ UFC.ml}^{-1}$ , y no pudo detectarse  $\delta$ -endotoxina al final del proceso. Es evidente que la interrupción de la aireación antes del inicio de los mecanismos que conducen a la formación del espora provoca la total supresión de los mismos. Lo mismo puede decirse de la formación de la  $\delta$ -endotoxina. Norris (1969) indica que al interrumpir el suministro de oxígeno durante la fase logarítmica, el crecimiento de las células de *Bacillus thuringiensis* (Tolworthi) se detiene de modo súbito, y que se suprimen la esporulación y la formación del cristal.

Sin embargo, los resultados del Experimento 7 indicarían que, una vez que la esporulación se ha disparado, continúa hasta ser completa. No es el caso de la síntesis de  $\delta$ -endotoxina, la cual se ve afectada de modo muy severo, y sólo es

obtenida una fracción del rendimiento esperado. El oxígeno debe ser suministrado sin interrupción para alcanzar altas concentraciones de  $\delta$ -endotoxina. Puede asumirse que los consumos de ATP para la síntesis de un gramo de proteína y para la formación de un gramo de esporos son similares (la composición macromolecular de un espora indica un 78 % en peso de proteínas, con lo que la suposición estaría justificada).

Estas conclusiones contrastan con las que se derivan de la patente otorgada a Zamola y Kajfez (1977), quienes proponen un método de producción de una variedad no especificada de *Bacillus thuringiensis* en el que los cultivos alternan períodos de 12 h de aireación vigorosa y períodos de 3 h con aireación interrumpida. Los autores sostienen que la interrupción de la aireación suprime la esporulación, obteniendo mayores rendimientos en toxina.

#### 4.5. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados presentados en este Capítulo permite extraer las siguientes conclusiones:

- Los rendimientos  $Y_{x/s}$  e  $Y_{x/o}$  alcanzados muestran ser muy sensibles frente a las condiciones de aireación. Los cultivos limitados en oxígeno presentan valores de  $Y_{x/s}$  mucho más bajos que los obtenidos en condiciones de no limitación. Sin embargo, los rendimientos en oxígeno muestran ser más elevados en los cultivos realizados en condiciones de no limitación. Esto implicaría un mayor acoplamiento entre crecimiento y la producción de energía.
- Los valores de velocidad específica de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ) en cultivos limitados son alrededor de cinco veces menores que las observadas en cultivos no limitados.
- La esporulación llega a completarse si el cultivo alcanza el máximo valor de biomasa, aún cuando se haya interrumpido la aireación. Por el contrario, la síntesis de  $\delta$ -endotoxina no llega a ser total si la aireación se interrumpe, y llega a suprimirse si la interrupción ocurre antes de que el cultivo alcance la máxima concentración de biomasa.
- La aireación es un factor de capital importancia en la producción de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y la limitación por oxígeno impide obtener un producto con altos niveles de toxina. Por lo tanto, esta situación debe ser evitada si se intenta la producción de bioinsecticidas basados en este microorganismo.

---

## **5 Cultivos discontinuos alimentados**

---

## 5.1. INTRODUCCION.

Tanto en procesos químicos como en procesos microbianos hay dos modos de operación bien diferenciados: batch y continuo. En un proceso en batch todos los nutrientes requeridos por el microorganismo (excepción hecha del oxígeno - en procesos aeróbicos- y de las soluciones de ácidos y/o álcalis, empleadas para el control del pH) son incorporados al medio antes del inicio de la fermentación. En un proceso continuo todos los nutrientes ingresan al reactor de modo continuo, al tiempo que el medio "agotado" egresa del reactor a la misma velocidad con que ingresa el medio fresco, manteniéndose así el volumen constante.

En un sentido amplio, una técnica de cultivo de microbios en la cual uno o más nutrientes se suministran al biorreactor durante el cultivo, permaneciendo los productos dentro del reactor hasta el final del proceso, es llamada *cultivo discontinuo alimentado*. En la literatura suele encontrarse que esta técnica es mencionada con las siguientes expresiones: *fed-batch*<sup>1</sup> o *semi-batch* (inglés), o *cultivo por lotes alimentados*, *cultivo por cargas alimentadas*, *cultivo discontinuo alimentado* o *batch alimentado* (castellano). En este trabajo será utilizada esta última expresión, por ser la de uso más común en la jerga. La expresión *cultivo extendido* se refiere a un tipo particular de batch alimentado, al cual se hará referencia más adelante.

### 5.1.1. CARACTERISTICAS DE UN CULTIVO BATCH ALIMENTADO.

La característica básica de los procesos microbianos en batch alimentado es que las concentraciones de nutrientes dentro del reactor pueden ser controladas a voluntad mediante cambios en la velocidad de alimentación de nutrientes. En un batch ideal, las concentraciones de nutrientes no son controlables, y disminuyen de modo progresivo. En un cultivo continuo ideal, en estado

---

<sup>1</sup>Pirt (1974) indica que Yamane *et al.* (1973) acuñaron la expresión *fed-batch cultures*. Sin embargo, Yamané y Shimizu (1984) mencionan a Burrow (1970) como el primero en emplear ese término.

estacionario, las concentraciones de todos los nutrientes (incluyendo al limitante del crecimiento) permanecen constantes.

Respecto del ambiente en el que se desarrollan los microorganismos, el batch alimentado se ubica entre las operaciones batch ideal y continuo ideal.

### 5.1.2. UTILIDAD DE LAS TECNICAS DE BATCH ALIMENTADO.

El batch alimentado es superior a la operación batch convencional, en especial cuando la variación de la concentración de uno o más nutrientes afecta al rendimiento del microorganismo o de alguno de sus metabolitos. Las otras ventajas que presenta este tipo de cultivo se relacionan con la supresión de los efectos que las altas concentraciones de nutrientes ejercen sobre el crecimiento de los microorganismos (inhibición por sustratos, efecto glucosa, represión catabólica, etcétera).

### 5.1.3. CLASIFICACION DE LAS TECNICAS DE CULTIVO EN BATCH ALIMENTADO.

Las técnicas de batch alimentado han sido aplicadas desde comienzos del siglo 20, cuando se descubrió que, en la producción de levaduras a partir de mosto de malta, la concentración de mosto debía mantenerse baja para prevenir la ocurrencia de condiciones de anaerobiosis, causadas por la elevada velocidad de crecimiento de los microorganismos. Así, el mosto era agregado a una velocidad menor que la demanda, aumentando los rendimientos y sin producción de etanol.

El propósito principal de una operación en batch alimentado es el control de la concentración de sustrato dentro del medio líquido. Cuando se intenta el diseño de un cultivo batch alimentado, deben tomarse dos decisiones iniciales: a) tipo de nutriente, y b) modo de aplicación.

El nutriente a usar debe ser seleccionado haciendo énfasis en el conocimiento de la fisiología, bioquímica y genética del microorganismo; es inevitable tomar en consideración la posibilidad de inhibición por sustrato. Muchas veces se debe trabajar con estrategias de "prueba y error" hasta dar con

el sustrato ideal para controlar el crecimiento. La selección del modo de alimentación se basa, más que nada, en consideraciones de tipo ingenieril, las que permiten encontrar el modo óptimo de alimentación.

Así, puede hacerse una clasificación de los procesos en batch alimentado, aplicados a procesos microbianos, basada en el tipo de control (Tabla 5.1)

---

**TABLA 5.1.** Clasificación de los procesos batch alimentado según el modo de control de agregado de sustrato (adaptada de Yamané y Shimizu 1984).

---



---

**A sin control feedback**

- adición intermitente
- velocidad constante
- aumento exponencial
- optimizado
- otros

---

**B con control feedback**

- control feedback indirecto (pH, O<sub>2</sub> dis, CR)
  - control feedback directo (conc de sustrato)
  - control con valor constante
  - control óptimo
- 

Es evidente que toda nueva metodología de operación es ensayada para obtener mayores rendimientos y/o productividades. Nuevas técnicas de medida y control han permitido el uso de modos de alimentación más sofisticados, cuyos detalles no suelen ser divulgados, por pertenecer al *know-how* de cada proceso industrial.

Los métodos más usados son el cultivo batch alimentado con caudal constante, el batch alimentado con caudal exponencial, el batch extendido y el batch alimentado repetido.

#### 5.1.4. APLICACIONES DE PROCESOS BATCH ALIMENTADO.

Hay un gran número de productos que se obtienen en escala industrial mediante cultivos en batch alimentado. Los procesos típicos son los destinados a la producción de levadura de panificación (biomasa) y a la producción de antibióticos (penicilina, griseofulvina, estreptomycin, entre otros). Estos procesos han servido, además, para el desarrollo de la teoría de batch alimentado (Pirt 1974). En la Tabla 5.2 se presentan algunos procesos típicos desarrollados en batch alimentado.

**Tabla 5.2.** Algunos de los procesos de obtención industrial de productos mediante procesos en batch alimentado.

| Microorganismo o producto       | Sustrato alimentado | Parámetro de control | Tipo de alimentación        |
|---------------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Melaza              | Oxígeno disuelto     | <i>On-off</i> o control PID |
| <i>Pseudomonas sp.</i>          | Metanol             | --                   | velocidad constante         |
| <i>Cellulomonas sp.</i>         | Celulosa            | --                   | gradiente lineal            |
| <i>Pichia methanotherma</i>     | Metanol             | --                   | adición intermitente        |
| <i>Candida utilis</i>           | Ac. acético         | --                   | control automático          |

**Tabla 5.2. (continuación).** Algunos de los procesos de obtención industrial de productos mediante procesos en batch alimentado.

| Microorganismo o producto | Sustrato alimentado | Parámetro de control              | Tipo de alimentación                              |
|---------------------------|---------------------|-----------------------------------|---|
| Penicilina                | Nutrientes          | pH                                | intermitente                                      |
|                           | Glucosa             | balance de materia <i>on-line</i> | velocidad constante                               |
|                           | Ac. fenilacético    | --                                | intermitente                                      |
|                           | Sacarosa            | concentración de sacarosa         | variada, para mantener la concentración constante |
|                           | Lactosa             | --                                | intermitente                                      |
| Estreptomicina            | Glucosa Amonio      | --                                | intermitente                                      |
| Grisofulvina              | Azúcar              | --                                | perfil predeterminado                             |
| Novobiocina               | Nutrientes          | --                                | intermitente                                      |
| Acido glutámico           | Urea                | --                                | intermitente                                      |
| Tirosina                  | Fenol               | --                                | optimizado  |
| Lisina                    | Nutriente           | --                                | optimizado  |
| $\beta$ -galactosidasa    | Glicerol            | --                                | velocidad constante                               |
| Celulasa                  | Glucosa             | --                                | velocidad constante                               |
| $\alpha$ -amilasa         | Almidón             | --                                | velocidad variable                                |

## 5.2. TEORIA MATEMATICA DEL BATCH ALIMENTADO SIN CONTROL RETROALIMENTADO.

En batch alimentado sin control retroalimentado la velocidad de alimentación sigue un comportamiento predeterminado. El modo más primitivo de batch alimentado sin control retroalimentado es el agregado intermitente de sustrato, el cual no presenta fundamento matemático alguno.

### 5.2.1. EL MODELO MATEMATICO

Se asumen un biorreactor con mezclado perfecto, en el cual el crecimiento de los microorganismos se limita por la concentración de un sustrato, y el resto de los nutrientes está en exceso. Se considera que sólo el sustrato limitante del crecimiento es suministrado al reactor a una velocidad de alimentación variable o constante, y que todo el caldo de cultivo permanece en el reactor. La nomenclatura empleada se explica en la Sección 5.

Los balances generales para reactores con volumen de cultivo variable serán los siguientes

#### a) Balance global para la fase líquida:

velocidad de acumulación = velocidad de ingreso

En términos matemáticos, empleando velocidades de flujo, densidad del líquido y volúmenes, el balance de masa para un tanque con mezclado perfecto será:

$$\frac{d(V \cdot \rho)}{dt} = F \cdot \rho_r \quad (5.1)$$

Si los cambios de densidad no son apreciables, la velocidad de cambio de volumen podrá escribirse como:

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (5.2)$$

**b) Balance de biomasa en fase líquida:**

velocidad de acumulación de biomasa = biomasa que ingresa + biomasa que se forma

O, en términos matemáticos,

$$\frac{d(x_1.V)}{dt} = r_{x_1}.V \quad (5.3)$$

Si la cinética de crecimiento es  $r_x = \mu.x_1$ , y si  $\mu$  sigue una cinética de tipo Monod, el balance se podrá escribir como:

$$\frac{d(x_1.V)}{dt} = \left( \frac{\mu_{max} . S_1}{K_s + S_1} \right) . x_1 . V \quad (5.4)$$

Esta ecuación puede aplicarse en condiciones de estado no estacionarios, dinámicos o transitorios, excepción hecha de ciertas condiciones transitorias donde la ecuación de Monod no es válida. Esta sólo puede aplicarse en condiciones de estado estacionario o de cambios lentos, es decir estados de *crecimiento balanceado*. Este es un estado biológico durante el cual el metabolismo opera en condiciones de estado estacionario (Dunn y Mor 1975).

c) **Balance de sustrato en fase líquida:**

velocidad de acumulación de sustrato = velocidad de ingreso - velocidad de consumo

De nuevo, en términos matemáticos:

$$\frac{d(S_1.V)}{dt} = F \cdot S_r - \left( \frac{\mu \cdot S_1}{K_s + S_1} \right) \cdot \frac{x_1 \cdot V}{Y_{x/s}} \quad (5.5)$$

El sistema considerado presenta tres variables ( $x_1$ ,  $V$ ,  $S_1$ ) y tres ecuaciones independientes que lo describen (5.2, 5.4 y 5.5); la resolución simultánea de estas tres permite describir la variación de  $x_1$ ,  $V$  y  $S_1$  con el tiempo. Las restricciones impuestas son: reactor con mezclado perfecto, un sólo sustrato limitante, crecimiento balanceado, rendimiento constante y cinética tipo Monod (aunque es posible el uso de otro tipo de cinéticas, con los pertinentes cambios en las ecuaciones).

### 5.2.2. CULTIVOS BATCH ALIMENTADO CON VELOCIDAD DE ALIMENTACION VARIABLE

La alimentación en los cultivos batch alimentado puede seguir distintos perfiles. El caso más simple es aquel en el cual  $F$  y  $S_r$  son constantes<sup>2</sup>. En este trabajo serán analizados dos tipos de cultivo batch alimentado con velocidad de alimentación variable:

a) Alimentación con  $F$  constante y  $S_r$  variable: **batch alimentado lineal.**

b) Alimentación con  $S_r$  constante y  $F$  variable: **batch alimentado exponencial.**

---

<sup>2</sup> La nomenclatura empleada se indica en la Sección 5.2.2.5.

### 5.2.2.1. BATCH ALIMENTADO LINEAL

En este caso, la ecuación de balance de sustrato (5.5) se transforma en:

$$\frac{d(SV)}{dt} = F_r \cdot S_r(t) - \frac{\mu \cdot X_1 \cdot V}{Y_{x/s}} \quad (5.6)$$

Para evitar la acumulación de sustrato en el reactor, debe cumplirse la condición

$$F_r \cdot S_r \leq \frac{(\mu_{max} \cdot X_0 \cdot V_0)}{Y_{x/s}} \quad (5.7)$$

Para que no haya acumulación de sustrato a  $t > 0$ , el gradiente de velocidad de alimentación a  $t = 0$  debe ser igual o menor que la variación en la velocidad de consumo de sustrato, o sea:

$$\frac{d(F_r \cdot S_r(t))}{dt} \leq \frac{d}{dt} \left[ \frac{\mu_0 \cdot X_0 \cdot V_0 \cdot \exp(\mu \cdot t)}{Y_{x/s}} \right] \quad (5.8)$$

Si  $F_r$  es constante y  $S_r(t) = a + b \cdot t$ , la ecuación que describe la variación de la biomasa total será:

$$\frac{d(X_1 \cdot V)}{dt} = Y_{x/s} \cdot F_r \cdot S_r(t) \quad (5.9)$$

Por integración se obtiene:

$$X_1 \cdot V = X_0 \cdot V_0 + Y_{x/s} \cdot F_r \cdot \left( a \cdot t + \frac{b}{2} \cdot t^2 \right) \quad (5.10)$$

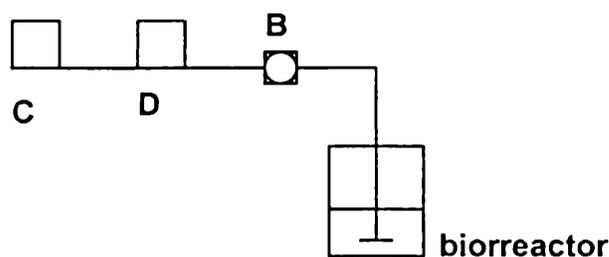
El crecimiento se acomoda a la variación de sustrato limitante;  $x_f V$  varía con  $t$  de modo cuadrático.

El dispositivo para generar el gradiente lineal se esquematiza en la Figura 5.1. Se compone de un reservorio  $C$  conectado a otro reservorio  $D$  desde el cual, por medio de una bomba peristáltica, se suministra medio al reactor. El medio que sale de  $D$  es reemplazado por medio concentrado proveniente de  $C$ , generándose en el primero un gradiente lineal de concentración. Los volúmenes en los reservorios  $C$  y  $D$  son, en todo momento, iguales entre sí.

---

**Figura 5.1.** Esquema del dispositivo empleado en la generación de un gradiente lineal en los cultivos batch alimentado lineales de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. C: Reservorio de medio concentrado; D: reservorio de medio diluido. B: bomba peristáltica.

---



El diseño experimental requiere conocer el caudal ( $F$ ) y las concentraciones en los reservorios concentrado ( $S_c$ ) y diluido ( $S_d$ ). Estas se pueden deducir a partir del desarrollo que antecede, obteniéndose:

$$F = \frac{b + \sqrt{b^2 + 4b\mu_0 l'_0}}{2} \quad (5.11)$$

con  $b = \frac{2\mu_0 X_0 l'_0 d_0}{\Delta(xV)_f}$

$$F \cdot S_{do} = \frac{\mu_o X_o I_o}{Y_{x/s}} \quad (5.12)$$

$$(S_c + S_{do}) = \frac{\Delta(X I')_f}{Y_{x/s}} \quad (5.13)$$

Con las Ecuaciones 5.11, 5.12 y 5.13 es posible diseñar un batch alimentado lineal, de caudal constante  $F$  y concentraciones iniciales  $S_c$ , en el reservorio concentrado, y  $S_{do}$ , en el reservorio diluido.

#### 5.2.2.2. BATCH ALIMENTADO EXPONENCIAL.

Las ecuaciones que describen la dinámica del batch alimentado exponencial son:

$$\frac{d(x I')}{dt} = \mu \cdot x_1 \cdot I_1 \quad (5.14)$$

$$\frac{d(S I')}{dt} = F(t) \cdot S_r - \frac{\mu \cdot x_1 \cdot I_1}{Y_{x/s}} \quad (5.15)$$

$$\frac{dV'}{dt} = F(t) \quad (5.16)$$

El caudal variará de modo exponencial según una ley del tipo:

$$F(t) = A \cdot \exp(B \cdot t) \quad (5.17)$$

con  $A$  y  $B$  constantes positivas arbitrarias.

Por lo tanto, la variación del volumen será

$$V = V_0 - \frac{A}{B} + \frac{A}{B} \cdot \exp(B \cdot t) = V_0 + \frac{A}{B} [\exp(B \cdot t) - 1] \quad (5.18)$$

El tiempo máximo de operación tiene un límite, impuesto por el máximo volumen de trabajo del fermentador:

$$t \leq \frac{1}{B} \left[ \frac{B}{A} (V_{max} - V_0) + 1 \right] \quad (5.19)$$

Las dinámicas para sustrato y biomasa serán:

$$\frac{dS}{dt} = \left[ \frac{B \cdot (S_r - S_1)}{(V_0 \cdot B - A) \frac{\exp(-B \cdot t)}{A} + 1} \right] - \frac{\mu \cdot X_1}{Y_{x/s}} \quad (5.20)$$

$$\frac{dX}{dt} = \left[ \frac{B \cdot X_1}{(V_0 \cdot B - A) \frac{\exp(-B \cdot t)}{A} + 1} \right] - \mu \cdot X_1 \quad (5.21)$$

### 5.2.2.3. EL CULTIVO EXTENDIDO.

Un cultivo extendido es un batch alimentado en el cual la velocidad de ingreso de sustrato es manipulada de modo continuo, de forma tal que la concentración de sustrato limitante se mantenga constante en todo momento. Por lo tanto, el análisis de un cultivo extendido puede realizarse usando las

ecuaciones para un batch alimentado. La concentración de sustrato limitante deseada es  $S_{ex}$ , el caudal requerido para mantener  $S_I = S_{ex}$  es  $F_{ex}$ , y el volumen de cultivo es  $V_{ex}$ . Así, la condición de diseño será:

$$\frac{dS}{dt} = 0$$

entonces

$$F_{ex} = \frac{\mu \cdot x_1 \cdot V_1}{Y_{x/s} \cdot (S_r - S_{ex})} \quad (5.22)$$

El sistema puede manipularse de modo que la concentración de sustrato al iniciarse la alimentación sea igual a  $S_{ex}$ . Si se asume que  $\mu = g(S_{ex})$ , si  $S_{ex}$  es constante,  $\mu$  será constante. Si la concentración de sustrato en la alimentación,  $S_r$ , es constante,  $F_{ex}$  deberá variar de modo proporcional a la biomasa total  $x_1 \cdot V_{ex}$ , según:

$$F_{ex} = \left[ \frac{\mu}{(S_r - S_{ex})} \right] \cdot \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot x_1 \cdot V_{ex} \quad (5.23)$$

Entonces, si la biomasa total aumenta de modo exponencial, el caudal también deberá aumentar de modo exponencial, para que se cumpla la condición  $S_{ex} = \text{constante}$ .

Asumiendo que  $\mu$  y  $r_s$  dependen de  $S_{ex}$ , puede obtenerse la variación de  $x_1 \cdot V_{ex}$ , dada por:

$$x_1 \cdot V_{ex} = x_0 \cdot V_0 \cdot \exp(\mu \cdot t) \quad (5.24)$$

con  $\mu = \mu(S_{ex})$

La ecuación (5.24) establece que la biomasa total aumenta de modo exponencial. Sustituyendo en (5.21), resulta:

$$F_{ex} = \frac{\mu}{Y_{x/s}} \frac{x_o \cdot V_o}{(S_r - S_{ex})} \exp(\mu \cdot t) = F_{ex_o} \cdot \exp(\mu \cdot t) \quad (5.25)$$

con  $F_{ex_o}$  = caudal inicial.

Por lo tanto, si  $\mu$  y  $Y_{x/s}$  dependen sólo de la concentración de sustrato limitante, el cultivo extendido (en el cual la concentración de sustrato se mantiene constante a su valor inicial,  $S_o = S_{ex}$ ) equivale a un batch alimentado exponencial, con el caudal dado por la 5.23.

Edwards *et al.*(1970), interpretando el trabajo de Martin y Felsenfeld (1964), asumen una función exponencial arbitraria de la forma  $F_r = A \cdot \exp(B \cdot t)$ . El análisis que antecede pone límites a esta expresión, por lo que los parámetros  $A$  y  $B$  deben estar restringidos para mantener  $S_{ex}$  = constante.

Así,  $F_{ex_o}$  depende de la cantidad de biomasa inicial  $x_o \cdot V_o$ , de la concentración inicial de sustrato  $S_{ex_o}$ , de la velocidad específica de consumo de sustrato ( $\mu / Y_{x/s}$ ) y de la concentración de sustrato en el medio que ingresa al reactor,  $S_r$ .

La concentración celular variará según

$$x_1 = x_o \frac{V_o}{V_r} \exp(\mu \cdot t) = \frac{x_o}{\left[ 1 - \frac{x_o}{Y_{x/s}(S_r - S_{ex})} \right] \cdot \exp(-\mu \cdot t) + \frac{x_o}{Y_{x/s}(S_r - S_{ex})}} \quad (5.26)$$



Si se define el término  $C = \frac{1}{\mu} \frac{F_{ex_o}}{V_o} = \frac{x_o}{Y_{x/s}(S_r - S_{ex_o})}$ ,

la concentración de biomasa,  $x_1$ , variará según el valor que tome  $C$ . Si  $C < 1$ ,  $x_1$  aumentará; si  $C > 1$ ,  $x_1$  disminuirá; si  $C = 1$ ,  $x_1$  será constante e igual a  $x_o$ .

El batch alimentado exponencial es el modo más adecuado de obtener las máximas cantidades de biomasa en tiempos cortos con un sustrato que presente

$t_{lag}$  prolongado e inhibición por altas concentraciones de sustrato. Pueden obtenerse muy altos rendimientos, en cortos tiempos, mediante el empleo de batch alimentado exponencial con  $\mu \cong \mu_{max}$ .

#### 5.2.2.5. NOMENCLATURA

$F$ : caudal

$K_s$ : constante de saturación

$S_c$ : concentración de sustrato limitante en el reservorio concentrado

$S_d$ : concentración de sustrato limitante en el reservorio diluido

$r_x$ : velocidad de producción de biomasa

$S$ : concentración de sustrato limitante

$V$ : volumen

$t$ : tiempo

$x$ : concentración de biomasa

$Y_{x/s}$ : rendimiento de biomasa en base a sustrato consumido

#### **Símbolos griegos:**

$\rho$ : densidad

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento

$\mu_{max}$ : velocidad específica de crecimiento máxima

#### **Subíndices y superíndices:**

$ex$ : se refiere a cultivos extendidos

$f$ : final

$i$ : inicial

$max$ : valores máximos

$r$ : medio que ingresa al biorreactor

$0$ : valores iniciales

$l$ : variables dentro del biorreactor

### 5.2.3. CULTIVOS BATCH ALIMENTADO DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

La falta de esporulación y producción de  $\delta$ -endotoxina en cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* con altas concentraciones de nutrientes obliga a la búsqueda de una alternativa para alcanzar la meta propuesta. La alternativa más interesante es el cultivo batch alimentado. Diversas especies de *Bacillus* han sido cultivadas en batch alimentado (Kole *et al.* 1988; Moon y Parulekar 1991; Park *et al.* 1992; Harwood 1992), pero pocos autores han informado resultados obtenidos en cultivos batch alimentado de *Bacillus thuringiensis*. Arcas *et al.* (1987) y Kang *et al.* (1992) presentan resultados acerca de la obtención de esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* en batch alimentado, y Paige y Cooper (1990) emplean cultivos en batch alimentado para la obtención de  $\beta$ -exotoxina de *Bacillus thuringiensis*. Cayuela *et al.* (1993) utilizan la técnica de batch alimentado para cultivar una cepa recombinante de *Bacillus subtilis* que contiene el gen de la proteína CryI de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

Esta etapa, entonces, apunta hacia el estudio de cultivos batch alimentado de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, y la respuesta de este microorganismo frente a distintas estrategias de alimentación.

## 5.3. MATERIALES Y METODOS

5.3.1. MICROORGANISMO Y MEDIO DE MANTENIMIENTO. Fueron empleados el microorganismo y los medios de mantenimiento sólidos descritos en Sección 2.3.1.y siguientes

### 5.3.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

**Cultivos batch alimentado lineales:** los cultivos batch alimentado lineales (BAL) presentan un perfil lineal de concentración de nutrientes que ingresan al reactor. Los cultivos fueron diseñados mediante las ecuaciones (5.11), (5.12) y (5.13). Todos los cultivos fueron diseñados para alcanzar una concentración de biomasa de 25 g.l<sup>-1</sup>. Los cultivos comenzaron con un cultivo en batch en el

Medio X1, que fuera descrito en el Capítulo 3. Luego se alimentó según el diseño experimental que se muestra en la Figura 5.1. Las concentraciones de los nutrientes en los reservorios y los caudales de alimentación se indican en la Tabla 5.3.

Antes del comienzo de la alimentación, el volumen del medio en el reactor se ajusta a 2 litros; dado que el volumen total a alimentar es de 2 litros, el volumen final (sin considerar los volúmenes de muestreo ni los de ácido y/o álcali agregados para mantener el pH) es de 4 litros. De todos modos, para los cálculos finales fueron considerados los volúmenes reales (Esener *et al.* 1981).

**Tabla 5.3.** Concentraciones de glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio en los medios concentrado y diluido, y caudal de operación, empleados en los cultivos batch alimentados lineales (BAL).

| Componente                                      | BAL1 - LN |       | BAL2 - LN |       | BAL3 - LM |       | BAL4 - LM |       |
|---|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|
|   | $S_c$     | $S_d$ | $S_c$     | $S_d$ | $S_c$     | $S_d$ | $S_c$     | $S_d$ |
| Glucosa   | 184.3     | 17.8  | 184.3     | 17.8  | 105.0     | 15.0  | 105.0     | 15.0  |
| EL  | 3.7       | 46.1  | 46.1      | 3.7   | 46.1      | 3.7   | 18.0      | 2.6   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 6.9       | 5.4   | 10.0      | 6.9   | 10.0      | 6.9   | 15.2      | 10.5  |
| Caudal  | 42.2      |       | 42.2      |       | 42.2      |       | 50.0      |       |

Todas las concentraciones en g.l<sup>-1</sup>.  $S_c$ : Reservorio concentrado;  $S_d$ : reservorio diluido. Caudal: ml.h<sup>-1</sup>. La concentración del resto de los componentes del medio mantuvo las proporciones del Medio X7.

**Cultivos batch alimentado exponenciales:** los cultivos batch alimentado exponenciales (BAE) presentan perfiles de caudal de alimentación que varían de modo exponencial, con el fin de obtener crecimiento a distintos valores de  $\mu$  constantes. La variación del caudal se logró mediante el uso de una bomba peristáltica comandada por una computadora a través de una interfase analógica-digital, con un programa *ad hoc* que permite generar una variación exponencial

del caudal. El cultivo BAE1 se diseñó de modo tal que el medio completo (excepto los fosfatos) ingresara al reactor con un  $\mu$  de consigna de  $0.3 \text{ h}^{-1}$ . El cultivo BAE2 se alimentó también con el medio completo sin fosfatos, con un  $\mu$  de consigna de  $0.1 \text{ h}^{-1}$ . Ambos cultivos fueron inoculados con esporos provenientes de un cultivo batch con el medio X1 (ver Capítulo 3). El cultivo BAE3 se realizó alimentando el biorreactor con glucosa, mientras que el resto de los componentes del medio estaba presente en el biorreactor, inoculado con células vegetativas. El resto de los cultivos se inició con distintas concentraciones de glucosa en el fermentador, calculadas según la velocidad de alimentación preestablecida. En estos últimos se sembraron células vegetativas en fase exponencial de crecimiento, cultivadas en batch X7 (ver Capítulo 3). Estas fueron cosechadas a 3 - 4 h de cultivo, lavadas para eliminar restos de medio e inoculadas en el reactor conteniendo 2 litros de una solución de fosfatos y una cantidad de glucosa igual a la de consigna ( $S_{exo}$ ). En todos los cultivos se alimentó con un medio que contenía ( $\text{g.l}^{-1}$ ): glucosa, 50 ; extracto de levadura, 21.5; sulfato de amonio, 14.5;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 10.5;  $\text{PO}_4\text{KH}_2$ , 10.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3.55;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.35;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.55. Una vez finalizada la alimentación, el proceso es controlado hasta las 48 horas.

5.3.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS. Durante el período de alimentación se tomaron muestras, de volumen conocido, en las que se realizaron las acostumbradas determinaciones de biomasa, glucosa remanente, nitrógeno total, amonio, recuento de UFC, etcétera (ver Secciones 2.3.5.1. y siguientes).

5.3.4. BIOENSAYOS. Los bioensayos se realizaron según los protocolos sugeridos por la Organización Mundial de la Salud. En ellos se emplearon larvas de *Culex pipiens quinquefasciatus* en cuarto estadio temprano. Estas se obtuvieron a partir de huevos de mosquito, o de larvas de tercer estadio tardío, cedidas por el Centro de Estudios Parasitológicos y Vectores (CEPAVE, Facultad de Ciencias Naturales y Museo UNLP). En el caso de huevos, la cría de las larvas fue realizada desde la eclosión de los mismos hasta el momento del ensayo; en el caso de larvas se debía esperar hasta el momento de la muda para realizar el bioensayo. En ambas situaciones la cría se realizó en condiciones de temperatura controlada, cambiando las larvas a nuevos recipientes a medida que proceden las mudas. Para el bioensayo, se colocan 25 larvas en vasos plásticos conteniendo 150 ml de agua destilada, sin alimento; a ellos se agregan cantidades crecientes de suspensión de esporos y cristales, en concentraciones tales que la mortalidad

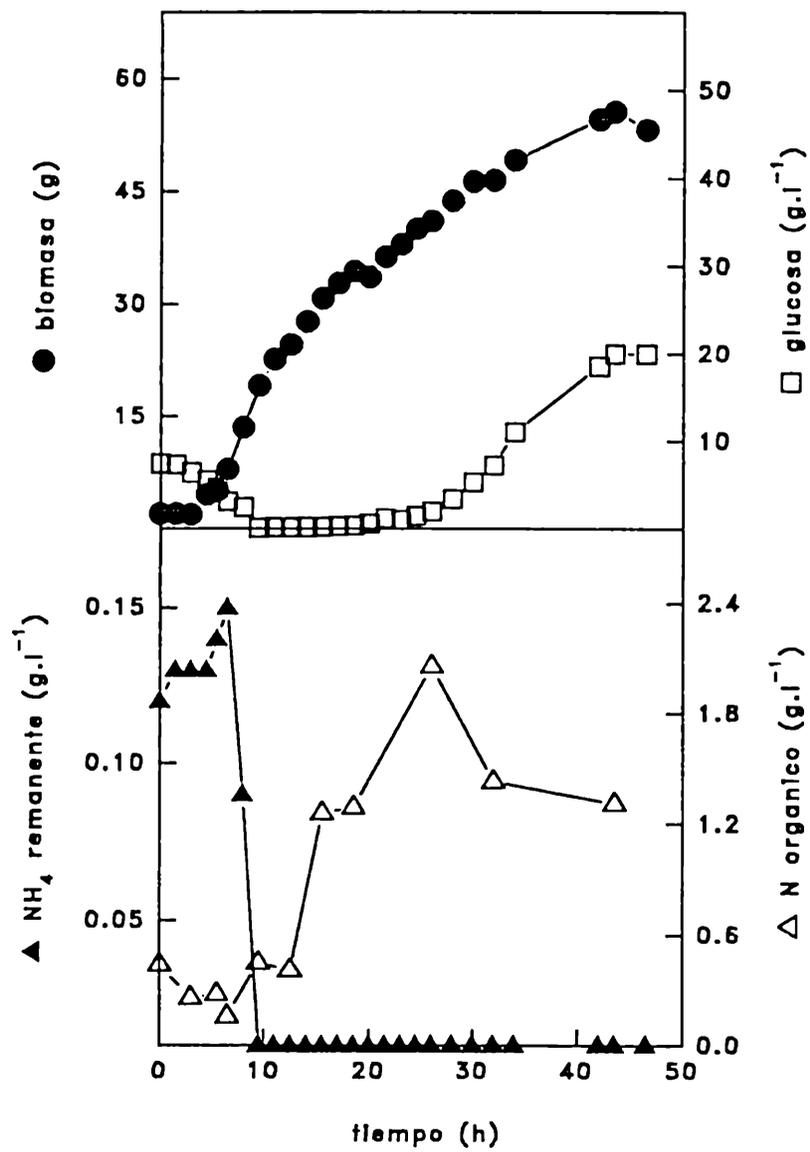
mortalidad no exceda el 95 % ni sea menor que el 5 % (para lo cual se impone un bioensayo tentativo previo). Los controles son realizados mediante un ensayo blanco (sin toxina) y un ensayo con el *standard* internacional IPS82 (Institut Pasteur, Paris), cuyo título es de 15000 Unidades Tóxicas Internacionales (UTI).mg<sup>-1</sup>. Mediante el análisis de *probits* se puede determinar la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>: concentración de toxina capaz de matar al 50 % de la población ensayada) y asignar el título de toxina por comparación con el IPS82.

### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSION

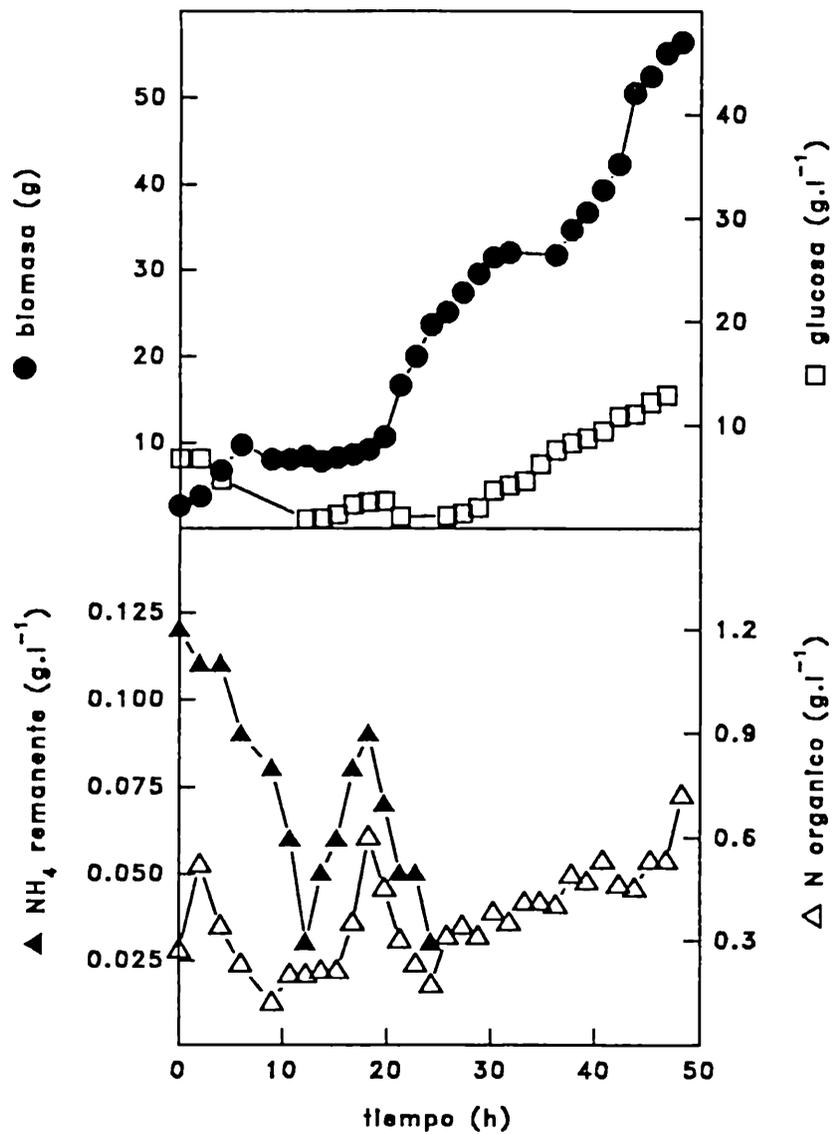
**5.3.1. Cultivos batch alimentado lineales.** Los resultados de los cultivos batch alimentado realizados con gradiente lineal de concentración de nutrientes, usando el medio LN, presentan los resultados que se muestran en la Tabla 5.4 y en la Figura 5.2. El BAL1 se realizó con un gradiente de extracto de levadura tal que la concentración disminuyera con el tiempo (gradiente negativo), para evitar posibles inhibiciones por la fuente de nitrógeno compleja. Este gradiente negativo fue ensayado para evitar la represión de la esporulación causada por la fuente de nitrógeno (ver Sección 3.5). Al disminuir la concentración de nitrógeno en el medio ingresante al reactor la represión desaparecería, permitiendo el comienzo de los eventos que llevan a la esporulación. El BAL2 presentó un gradiente lineal de extracto de levadura positivo.

En estos dos ensayos, el amonio pasó a ser el sustrato limitante del crecimiento a partir de las 12 (BAL1) y 18 (BAL2) horas de alimentación. Este fenómeno fue inesperado, toda vez que el medio estaba formulado manteniendo la misma relación entre los nutrientes que la existente en los medios X1 y X7, en los cuales el sustrato limitante es la glucosa (ver Capítulos 2 y 3). En las curvas de las Figuras 5.2 y 5.3 es posible observar que todo el amonio que ingresa es consumido, mientras que, si no todo, al menos la mayor parte del nitrógeno orgánico que ingresa al sistema es acumulado en el medio de cultivo. La concentración de biomasa presenta un gran aumento entre las 20 y las 30 h de cultivo, sin llegar al valor esperado de 25 g.l<sup>-1</sup>, seguido por un rápido aumento en el recuento de esporos. En ese momento (30 h de cultivo) la concentración de amonio se hace indetectable, y tanto el nitrógeno orgánico como la glucosa comienzan a acumularse. Sin embargo, parte de la glucosa es consumida.

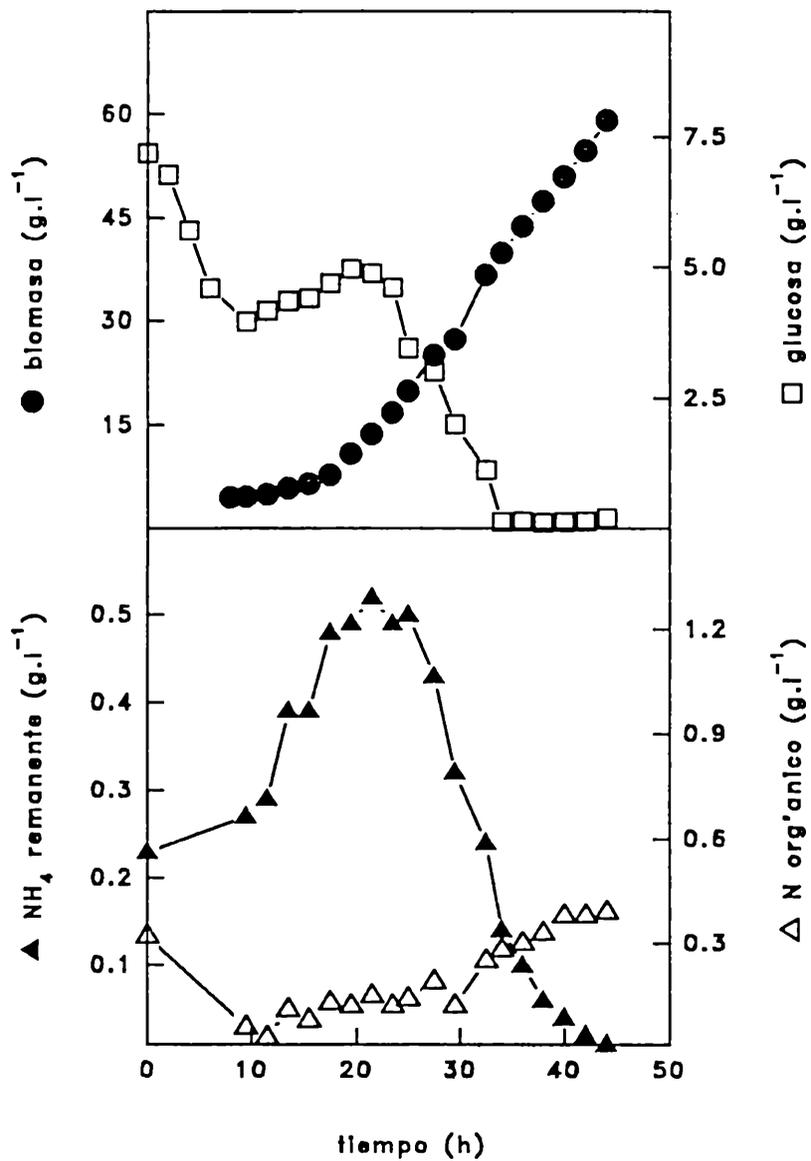
**Figura 5.2.** Curvas de producción de biomasa, y concentración de glucosa, de amonio y de nitrógeno orgánico remanentes obtenidas en el cultivo batch alimentado lincal BAL1.



**Figura 5.3.** Curvas de producción de biomasa, y concentración de glucosa, de amonio y de nitrógeno orgánico remanentes obtenidas en el cultivo batch alimentado lineal BAL2.



**Figura 5.4.** Curvas de producción de biomasa, y concentración de glucosa, de amonio y de nitrógeno orgánico remanentes obtenidas en el cultivo batch alimentado lineal BAL3.



Por lo tanto, para evitar que el amonio se agote antes que la glucosa, el medio fue reformulado. Así, se empleó el medio LM, cuya composición se presenta en la Tabla 5.3. En este caso pudo obtenerse una situación de limitación por glucosa (Figura 5.4). El resto de los resultados encontrados no muestran diferencias muy grandes respecto de los otros cultivos BAL.

En todos los cultivos la concentración de glucosa remanente fue elevada (11 - 20 g.l<sup>-1</sup>), excepto en aquel en el que se empleó el medio LM. Los resultados permitirían concluir que el fenómeno de esporulación requiere amonio para completarse. La formación de biomasa es un proceso durante el cual ambas fuentes de nitrógeno son consumidas, pero el nitrógeno inorgánico sería consumido de modo selectivo al comenzar la esporulación, hecho evidenciado por la disminución de amonio y la acumulación de nitrógeno orgánico. La parcial acumulación de glucosa tal vez se deba a que este sustrato sólo supe parte de los requerimientos energéticos propios de la esporulación.

El cultivo BAL4, en cambio, fue realizado empleando otra relación de nutrientes. Pudo observarse que la concentración de glucosa disminuyó a cero luego de 20 h de alimentación.

Es evidente que el metabolismo del nitrógeno de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* varía con el sistema de cultivo. En cultivos batch (ver Capítulo 2) la relación de nutrientes más apropiada para la producción de biomasa y  $\delta$ -endotoxina es glucosa:extracto de levadura:amonio 1:0.429:0.067. En batch alimentado lineal esta relación no es la más apropiada, y es necesario reformular el medio de cultivo para evitar que los cultivos se limiten en amonio. La relación de concentraciones más adecuada para cultivos en batch alimentado lineal es 1:0.172:0.214.

**Tabla 5.4.** Resultados obtenidos en los cultivos batch alimentado lineales (BAL).

| Cultivo | $x_{max}$ | Glucosa<br>remanente | Glucosa<br>consumida | N total | Recuento          | $\delta$ -<br>endotoxina | Título |
|---------|-----------|----------------------|----------------------|---------|-------------------|--------------------------|--------|
| BAL1    | 15.5      | 20.0                 | 139                  | 1.31    | $4.5 \times 10^9$ | 1.38                     | 517    |
| BAL2    | 15.3      | 12.9                 | 145                  | 0.72    | $3.4 \times 10^9$ | 0.79                     | 312    |
| BAL3    | 16.4      | 16.1                 |                      | 0.60    | $2.8 \times 10^9$ | 1.15                     |        |
| BAL4    | 15.4      | 0.2                  | 115                  | 0.39    | $3.1 \times 10^9$ | 1.00                     | 414    |

$x_{max}$ : concentración de biomasa al final de la alimentación ( $\text{g.l}^{-1}$ ). Glucosa remanente: concentración de glucosa al final de la alimentación ( $\text{g.l}^{-1}$ ). Glucosa consumida: glucosa consumida durante la alimentación (g). N total: nitrógeno remanente (según Kjeldahl) (g). Recuento: UFC al final de la alimentación ( $\text{UFC.ml}^{-1}$ ).  $\delta$ -endotoxina: concentración de  $\delta$ -endotoxina al final de la alimentación ( $\text{g.l}^{-1}$ ). Título: Unidades Tóxicas Internacionales cada  $10^8$  UFC.

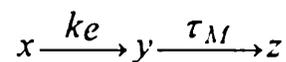
### 5.3.2. Cultivos batch alimentado exponenciales.

Los primeros ensayos mostraron la gran inestabilidad del sistema frente a distintas condiciones. En BAE1 ( $\mu_e$ :  $0.3 \text{ h}^{-1}$ ) se observó que los esporos no germinaron hasta pasadas 3 - 4 horas de iniciada la alimentación. Los componentes del medio se acumularon hasta la aparición de células vegetativas, y luego estas crecieron según un crecimiento exponencial de tipo batch. BAE2 mostró un comportamiento similar: la germinación de los esporos comenzó luego de 3 horas de iniciada la alimentación. Los nutrientes se acumularon en el medio y el  $\mu$  obtenido fue  $0.25 \text{ h}^{-1}$  mientras que el esperado era de  $0.1 \text{ h}^{-1}$ . En BAE3 (con  $\mu_e$ :  $0.3 \text{ h}^{-1}$ ), se observó que las células crecían de modo exponencial desde el momento de iniciar la alimentación, con un valor de  $\mu$  de  $0.5 \text{ h}^{-1}$ , a expensas de los compuestos presentes en el extracto de levadura.

Para obtener cultivos donde se pudiera controlar la velocidad específica de crecimiento los siguientes experimentos se realizaron alimentando con el medio

completo, pero inoculando células vegetativas (en fase de crecimiento exponencial). El biorreactor contenía glucosa en concentraciones crecientes. En todos los experimentos hubo acumulación de glucosa y de amonio, por lo que puede asumirse que el sustrato limitante del crecimiento pasó a ser algún componente presente en el extracto de levadura. Este resultado ser el único medio de controlar  $\mu$ . Los resultados obtenidos en estos experimentos se presentan en Tabla 5.5 y Figuras 5.5 a 5.8. En todos los casos se recuperó un valor de  $\mu$  experimental similar al valor de consigna.

Los niveles de esporulación al final de la alimentación muestran una relación directa con  $\mu$ : a mayor  $\mu$ , menor nivel de esporulación. Estos resultados pueden explicarse por el modelo de Dawes y Mandelstam (1970) para la esporulación de *Bacillus subtilis* en cultivo continuo. El modelo propone la existencia de células vegetativas ( $x$ ), células que inician la esporulación (células "iniciadas",  $y$ ) y esporos maduros ( $z$ ). La relación entre ellos está dada por



Las células vegetativas presentan una constante cinética de iniciación  $k_e$  proporcional a la diferencia entre  $\mu_{max}$  y  $\mu$

$$k_e = B.(\mu_{max} - \mu)$$

Las ecuaciones que representan este modelo son:

Las células vegetativas,  $x$ :

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x - k_e \cdot x \quad (5.27)$$

Las células iniciadas,  $y$ :

$$\frac{dy}{dt} = k_e \cdot x - [k(N) \cdot p(N)]_{t-\tau_M} \quad (5.28)$$

Y los esporos maduros,  $z$ :

$$\frac{dz}{dt} = Y_e \cdot [k(N) \cdot p(N)]_{t-\tau_M} \quad (5.29)$$

donde  $k(N)$  es el valor de  $k_e$  a  $t = t - \tau_M$ , y  $p(N)$  es el valor de  $x$  a  $t = t - \tau_M$ .

$\tau_M$  es el tiempo de maduración de los esporos, es decir el tiempo que tarda una célula iniciada en transformarse en un espora maduro.

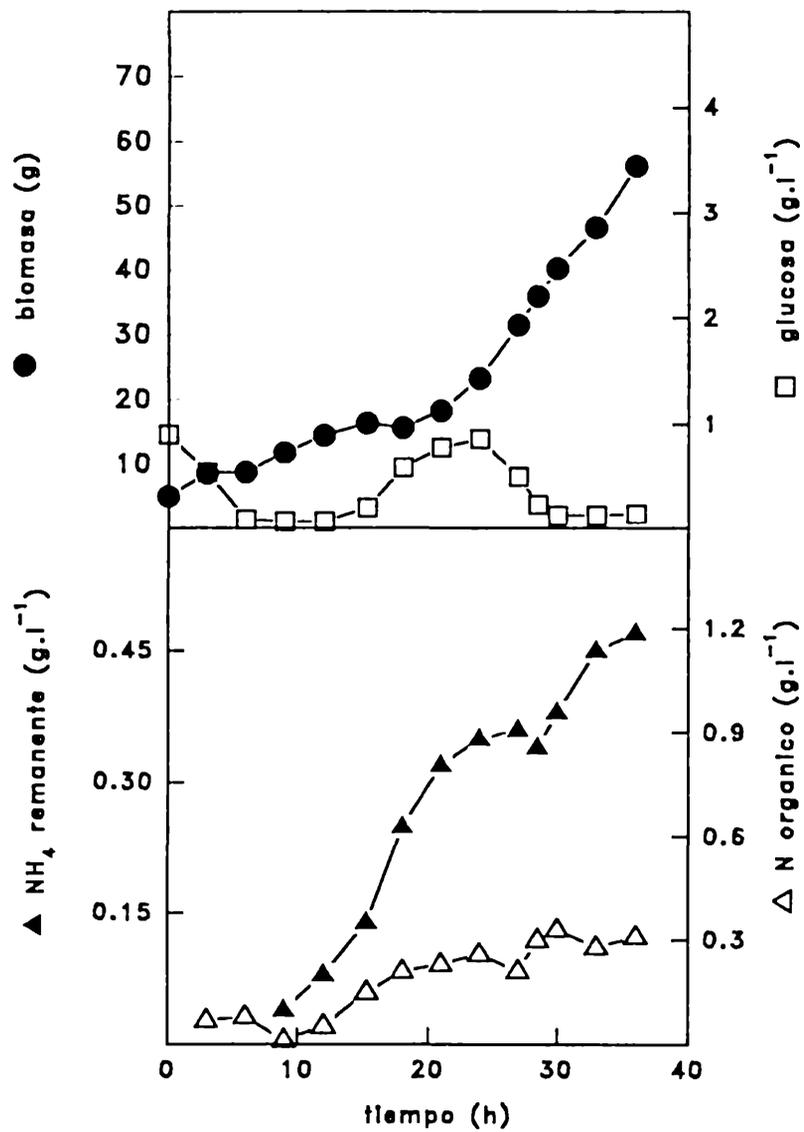
Si sólo las células vegetativas consumen glucosa, la ecuación de consumo será:

$$\frac{dS}{dt} = F \cdot S_f - \frac{\mu \cdot x}{Y_{x's}} \quad (5.30)$$

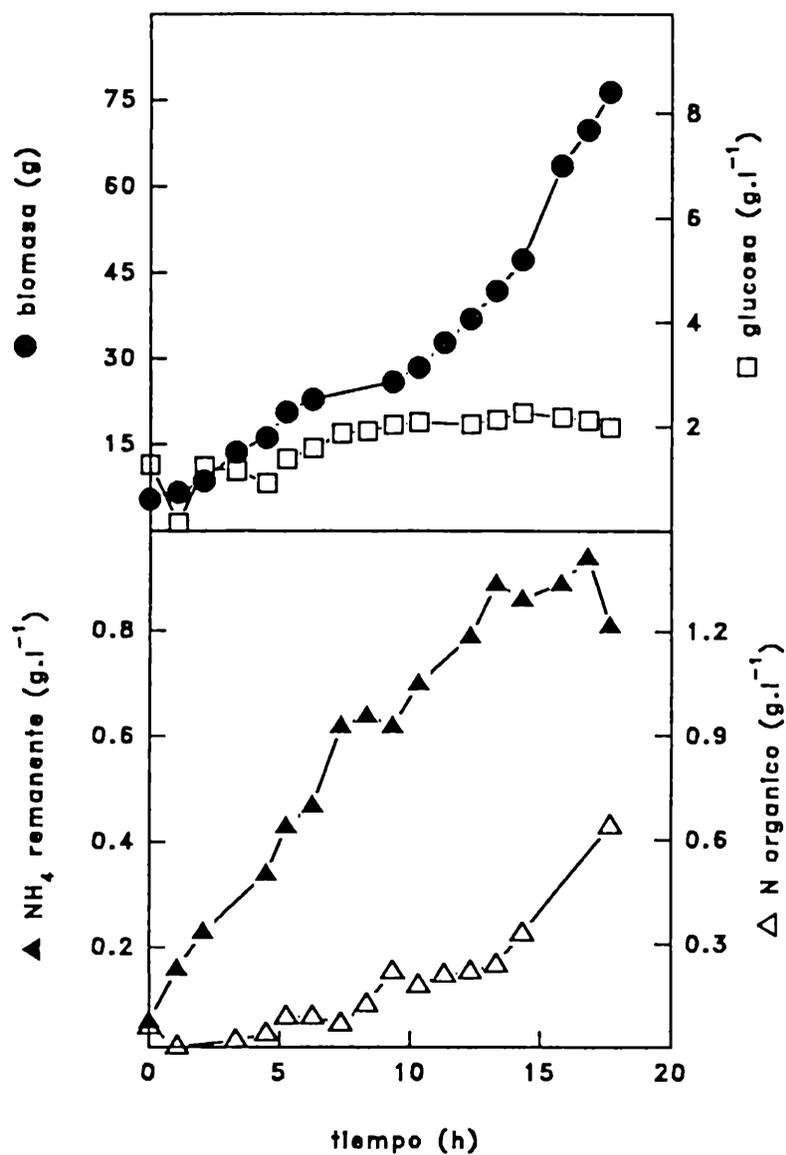
Si el crecimiento ocurre a valores de  $\mu$  cercanos a  $\mu_{max}$ ,  $k_e$  será muy pequeño y el crecimiento será vegetativo, con escasas células iniciadas y pocas que llegarán a esporos maduros. Así, al finalizar la alimentación el recuento de esporos será muy bajo. Si  $\mu_e$  es mucho menor que  $\mu_{max}$ , se tendrá el caso inverso. Es decir que el recuento de esporos al final de la alimentación varía con la velocidad de alimentación ( $\mu_e$ ) de modo inverso, tal como se observa en la Tabla 5.5. Los valores de recuento luego de 48 horas son algo mayores que los alcanzados al finalizar la alimentación.

La concentración de biomasa alcanzada al final de la alimentación fue variable, con una tendencia a disminuir con el aumento de  $\mu$ . Los rendimientos, sin embargo, fueron más altos que los alcanzados en batch y en batch alimentado lineal (Tabla 5.5). La obtención, en batch alimentado, de rendimientos mayores que los alcanzados en batch es un fenómeno conocido y que suele ser adjudicado a la posibilidad de control de  $\mu$  que ofrecen estos cultivos (Yamané y Shimizu 1984; Eppstein *et al.* 1989; Kleman y Strohl 1992).

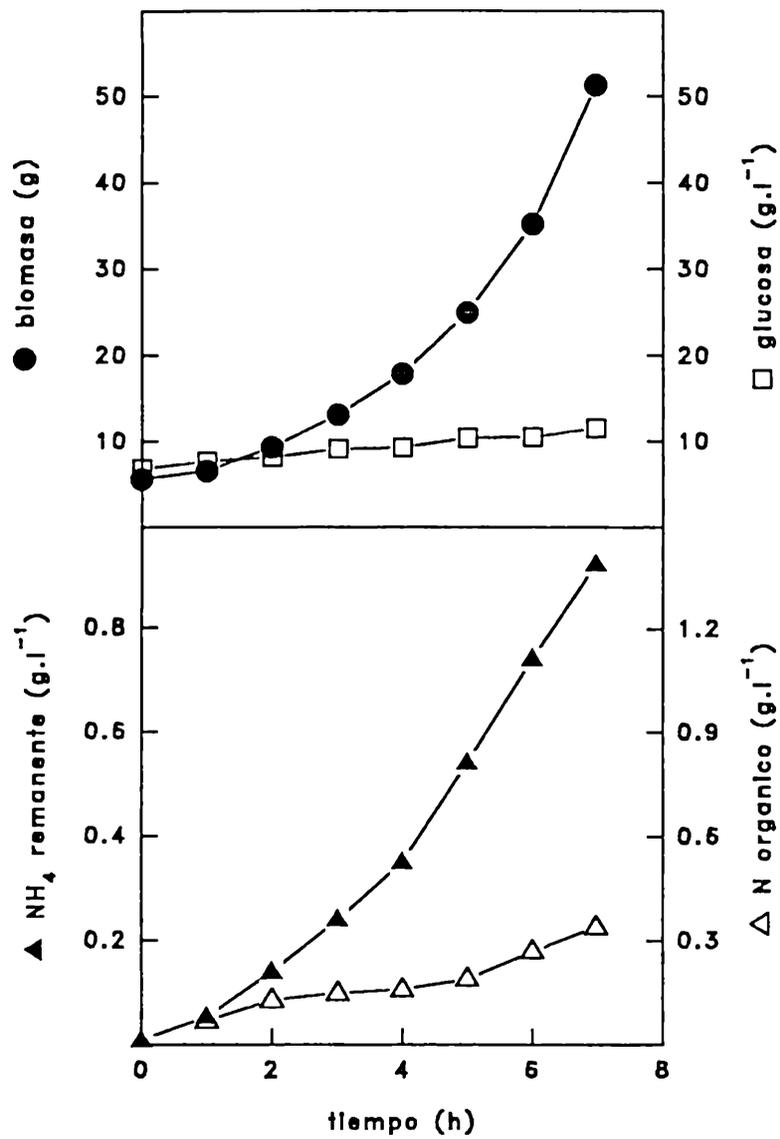
**Figura 5.5.** Curvas de producción de biomasa, y concentración de glucosa, de amonio y de nitrógeno orgánico remanentes obtenidas en el cultivo batch alimentado exponencial BAE1.  $\mu$ :  $0.07 \text{ h}^{-1}$ .



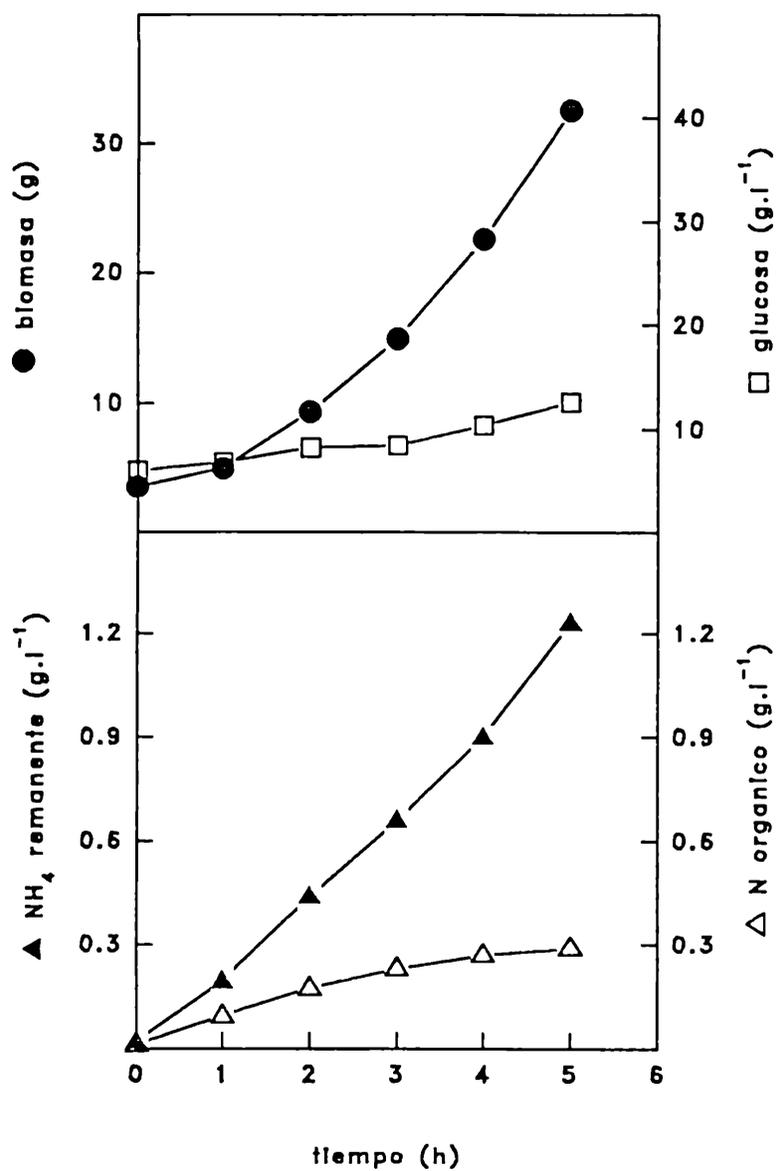
**Figura 5.6.** Curvas de producción de biomasa, y concentración de glucosa, de amonio y de nitrógeno orgánico remanentes obtenidas en el cultivo batch alimentado exponencial BAE2.  $\mu$ :  $0.15 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 5.7.** Curvas de producción de biomasa, y concentración de glucosa, de amonio y de nitrógeno orgánico remanentes obtenidas en el cultivo batch alimentado exponencial BAE4.  $\mu$ :  $0.265 \text{ h}^{-1}$ .



**Figura 5.8.** Curvas de producción de biomasa, y concentración de glucosa, de amonio y de nitrógeno orgánico remanentes obtenidas en el cultivo batch alimentado exponencial BAE5.  $\mu$ :  $0.54 \text{ h}^{-1}$ .



Según el modelo planteado, a mayor  $\mu$ , mayor sustrato disponible en el medio y mayor el número de células vegetativas. Estas consumirán la glucosa y el sustrato limitante del crecimiento, y, al disminuir la concentración de éste,  $k_c$  será mayor y las células iniciarán los procesos de esporulación (células  $y$ ). Si estas células requieren consumir el sustrato limitante del crecimiento para llegar a esporos maduros (células  $z$ ), el sistema permanecerá tal como se encuentra al final de la alimentación, ya que dicho sustrato se ha agotado. Si las células  $y$  no requieren sustrato para pasar a células  $z$ , la esporulación procederá hasta ser completa: el número de esporos será el mismo en todos los cultivos.

Los resultados obtenidos muestran que, después de finalizada la alimentación, el número de esporos alcanzado no llega a ser igual en todos los cultivos, y que la concentración de glucosa final es mayor a mayores velocidades de alimentación. A la luz de estos resultados podría concluirse que, en el caso de *Bacillus thuringiensis*, las células iniciadas requieren consumo del sustrato limitante para completar la esporulación.

La acumulación de glucosa observada podría explicarse si se tiene en cuenta que las células iniciadas no consumen glucosa, o lo hacen en menor proporción que las células  $x$  (Norris 1969). Por lo tanto, a medida que progresa el cultivo es menor la velocidad de consumo en relación a la de suministro de glucosa.

La acumulación de glucosa en los medios también podría explicarse por la inestabilidad del sistema. Yamané *et al.* (1977) realizan el análisis de estabilidad para cultivos batch alimentado exponencial. En ese análisis se demuestra que si  $\mu$  depende de la concentración de sustrato según una función  $g(s)$ , el sistema será estable si  $g'(s) > 0$ , y luego de una perturbación  $\Delta S$ , el sistema tenderá al valor de consigna. En caso contrario ( $g'(s) < 0$ ), el sistema estará en una zona inestable y divergirá. Esto podría explicarse según el siguiente análisis: en la zona de estabilidad, una variación en  $S$  (perturbación) provocaría un aumento en  $\mu$ , seguido por un aumento en  $x$ . Esto provocaría un aumento en el consumo de  $S$ , cuya concentración disminuiría tendiendo a su valor original. Un razonamiento análogo se sigue para una disminución en  $S$ .

En el caso de la condición de inestabilidad, un aumento en  $S$  implicaría una disminución en  $\mu$ , con la consecuente disminución en  $x$ ; esto trae aparejado un menor consumo de  $S$ , y, por lo tanto, un aumento en su concentración.

La máxima acumulación de glucosa se observa en los cultivos a mayores velocidades de alimentación, alcanzando un valor cercano a  $25 \text{ g.l}^{-1}$  cuando  $\mu = 0.63 \text{ h}^{-1}$ . Esta concentración de glucosa no es tan alta como para causar inhibiciones, tal como se discutió en el Capítulo 3. El mecanismo planteado antes podría explicar la acumulación de sustrato en los experimentos presentados.

Cayuela *et al.* (1993) cultivan una cepa recombinante de *Bacillus subtilis* en procesos batch alimentado controlados por el nivel de glucosa. Cuando emplean una cepa esporulada el nivel de control de glucosa (es decir, la concentración de glucosa más baja que pueden alcanzar en los cultivos) es de  $2 \text{ g.l}^{-1}$ . Si emplean una cepa mutante asporógena los niveles de control que se alcanzan son de  $0.2 \text{ g.l}^{-1}$  de glucosa, diez veces menor. Esto muestra de un modo explícito las dificultades que presentan los cultivos batch alimentado de microorganismos esporulados.

Kole *et al.* (1988), cultivando *Bacillus subtilis* en batch alimentado con control por oxígeno, obtienen cultivos en los que no se informa esporulación. Lo mismo ocurre en el trabajo de Strohl *et al.* (1986), quienes cultivan *Bacillus* sp. con un gradiente predeterminado. Moon y Parulekar (1991), con una cepa de *Bacillus firmus*, tampoco informan esporulación en cultivos batch alimentado para la producción de proteasas. Los niveles de esporulación alcanzados por Kang *et al.* (1993) no pueden confrontarse con los aquí informados debido a que esos autores emplean una estrategia de cultivo distinta.

**Tabla 5.5.** Resultados obtenidos en los cultivos batch alimentado exponencial.

| $\mu_{exp}$ | $Y_{x/s}$ | XV <sub>FA</sub> | %Ncons | UFC FA            | UFC FF            | $\delta$ -endotoxina | Título |
|-------------|-----------|------------------|--------|-------------------|-------------------|----------------------|--------|
| 0.07        | 0.58      | 56.5             | 65     | $2.2 \times 10^9$ | $2.6 \times 10^9$ | 0.30                 | 390    |
| 0.15        | 0.63      | 76.4             | 63     | $8.6 \times 10^8$ | $1.0 \times 10^9$ | 0.63                 |        |
| 0.265       | 0.66      | 35.3             | 24     | $5.1 \times 10^8$ | $7.0 \times 10^8$ | 0.60                 | 1140   |
| 0.34        | 0.76      | 43.7             | 36     | $9.4 \times 10^7$ | $5.6 \times 10^8$ | 0.67                 | 1600   |
| 0.50        | 0.82      | 60.9             | 15     | $4.6 \times 10^7$ | $3.0 \times 10^8$ | 0.71                 | 3900   |
| 0.54        | 0.86      | 32.8             | 15     | $1.7 \times 10^7$ | $1.6 \times 10^8$ | 0.57                 | 5600   |
| 0.63        | 0.93      | 25.0             | --     | $9.8 \times 10^6$ | --                | --                   | --     |

$\mu_{exp}$ : velocidad específica de crecimiento experimental ( $h^{-1}$ ). XV<sub>FA</sub>: biomasa al final de la alimentación (g);  $Y_{x/s}$ : Rendimiento celular [g biomasa.(g sustrato) $^{-1}$ ]. % Ncons: porcentaje de N consumido proveniente del amonio. UFC FA: UFC.ml $^{-1}$ , al final de la alimentación. UFC FF: UFC.ml $^{-1}$  a 48 h.  $\delta$ -endotoxina: concentración de proteína tóxica (g.l $^{-1}$ ) al final de la alimentación. Título: UTI cada  $10^8$  UFC.

En todos los casos hubo acumulación de amonio, siendo mayor a mayores valores de  $\mu$ . Así, el 63 % del nitrógeno consumido a  $\mu < 0.26 h^{-1}$  provino del amonio, mientras que a  $\mu > 0.26 h^{-1}$  sólo el 24 % del nitrógeno total fue aportado por el amonio, con tendencia a disminuir al aumentar  $\mu$ .

Estos resultados tienen estrecha relación con los resultados de los batch alimentados lineales, donde la concentración de amonio se hacía indetectable aún estando en una relación similar a la del medio de referencia.

Las concentraciones de  $\delta$ -endotoxina alcanzadas también fueron mayores al aumentar  $\mu$ , tendiendo a alcanzar los valores típicos de los cultivos en batch.

### 5.3.3. ACTIVIDAD TOXICA.

Cuando se realizan bioensayos con los productos activos (es decir el complejo espora-cristal) obtenidos en los cultivos batch alimentado lineal, con el

fin de determinar la concentración letal 50 del producto ( $CL_{50}$ ) y asignarle un título (relativo al *standard* internacional), se encuentra que los títulos alcanzados son un orden de magnitud menores que los alcanzados en el medio X7, tomado como referencia. En éste es posible alcanzar un título de alrededor de 5000 UTI por cada  $10^8$  UFC, el cual cae dentro del intervalo reportado por Pearson y Ward (1988) para cultivos batch de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* realizados empleando distintos medios de cultivo. En los BAL se obtienen títulos de 517, 312, y 414 UTI por cada  $10^8$  UFC (Tabla 5.4), diez veces menores que el del medio de referencia, cualquiera sea la limitación. Sin embargo, la esporulación no se ve afectada.

En los cultivos batch alimentado exponencial es posible observar una tendencia según la cual al aumentar  $\mu$  aumenta el título de toxina en relación al recuento de esporos: 390 UTI cada  $10^8$  UFC (para  $\mu = 0.07 \text{ h}^{-1}$ ) a 3900 UTI cada  $10^8$  UFC (para  $\mu = 0.50 \text{ h}^{-1}$ ), acercándose al valor típico al tender  $\mu$  a  $\mu_{max}$ . De todos modos la toxicidad por mililitro de cultivo es menor que la alcanzada en cultivos en batch.

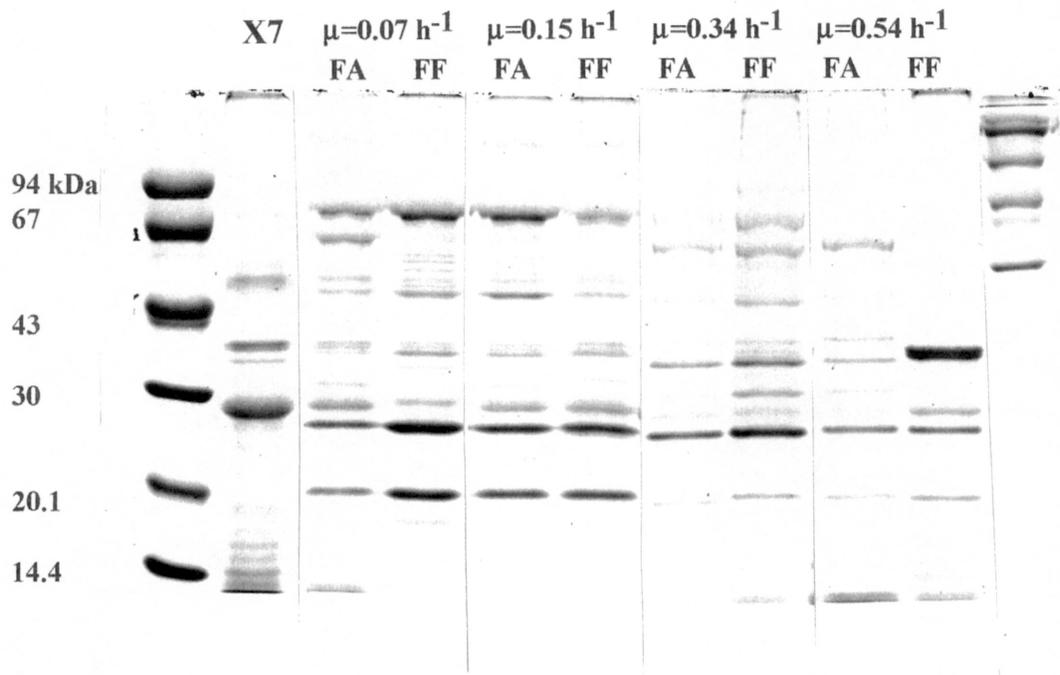
La incógnita que debe resolverse es la causa de la disminución de la actividad tóxica. Dado que, como se discutió en el Capítulo 1, la toxicidad se relaciona con la composición de los cristales, y que es esperable un sinergismo entre las distintas proteínas que componen el cristal, la respuesta podría encontrarse estudiando la composición de los cristales obtenidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

El resultado se observa en la Figuras 5.10 y 5.11. En la Figura 5.5 las calles 1 a 5 muestran el perfil de las proteínas que componen los cristales de los BAL 1 a 5, y las calles 6 a 8, el de los cristales de los cultivos X7, X1 no limitado, y X1 limitado por oxígeno. Nótese que los cristales obtenidos en los BAL presentan bandas que no están presentes en los cultivos en batch, una de ellas de alrededor de 30 kDa y la otra cercana a los 20 kDa. Las electroforesis de los cultivos en batch muestran el mismo perfil que los reportados en bibliografía.

Hay varias conjeturas que pueden hacerse; una de la hipótesis indicaría que en los BAL el ensamblado de las proteínas que forman el cristal sería defectuoso, por lo que éste no llegaría a completarse. Otra posibilidad sería que



**Figura 5.11.** Electroforetograma de cristales enteros obtenidos en cultivos batch alimentado exponenciales.



Cuando los cristales de los cultivos exponenciales son sometidos a electroforesis, se observa que la composición polipeptídica varía con  $\mu$ . En efecto, las muestras con menores valores de toxicidad (que son las cultivadas a menores  $\mu$ ) presentan una banda de 20 kDa, similar a la que aparece en los batch alimentados lineales. Esto indicaría que, a bajos valores de velocidad específica de crecimiento aparece una fracción polipeptídica inusual, adjudicable a alguna actividad proteolítica asociada al cristal, o bien al defectuoso ensamblado de las proteínas que lo conforman.

Resultados informados por distintos autores (Adams *et al.* 1989; Visick y Whiteley 1991) hacen mención de un polipéptido de 20 kDa, cuyo gen estaría ubicado en el mismo plásmido que el gen *cytA*, y que es sintetizado junto a la proteína CytA, formando parte del cristal. Estos autores postulan que, en una cepa recombinante de *Escherichia coli*, la proteína de 20 kDa es requerida para la producción del cristal, y le asignan una función de protección frente a la proteólisis (por la formación de un complejo con la proteína CytA) o bien una función estructural ("andamio") para el correcto ensamblado de los componentes del cristal. Otros autores confirman la existencia de la proteína, pero postulan que su presencia no es necesaria para la expresión de los genes *cryIVD* y *cytA* en *Bacillus thuringiensis* (Chang *et al.* 1993). Crickmore y Ellar (1992) discuten la existencia de una chaperonina, proteína que podría estar involucrada en la expresión del gen *cryIIA* de *Bacillus thuringiensis*. Los bajos niveles de toxicidad obtenidos en los cultivos batch alimentado lineal y exponencial podrían relacionarse de algún modo con la inusual presencia de esta proteína de 20 kDa.

#### 5.4. CONCLUSIONES.

- *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* puede ser cultivado en batch alimentado, tanto lineal como exponencial. Las condiciones iniciales del cultivo afectan de modo muy marcado la estabilidad del sistema en los batch alimentados exponenciales, debiendo ser iniciados con células en fase de crecimiento exponencial. La presencia de esporos al iniciarse la alimentación provoca la acumulación de sustrato, imposibilitándose el control del sistema.
- Las células que han iniciado los eventos que llevan a la esporulación parecen requerir el consumo de algún sustrato presente en el extracto de levadura. Al finalizar la alimentación la esporulación se suprime de modo casi total.
- Los cultivos lineales muestran que la asimilación del nitrógeno varía respecto de los cultivos batch. Medios que muestran crecimiento limitado por glucosa en batch son limitados en amonio en batch alimentado. Los cultivos exponenciales muestran que a mayor velocidad de alimentación, menor es el consumo del nitrógeno proveniente del amonio.
- La toxicidad por mililitro alcanzada en los cultivos lineales y exponenciales es un orden de magnitud menor que la alcanzada en cultivos batch.
- La relación toxina/recuento alcanzada en cultivos exponenciales aumenta con el aumento de la velocidad específica de crecimiento, hasta llegar a valores similares a los de cultivos batch con el medio de referencia. En los casos de toxicidad disminuida aparece, en el análisis de los polipéptidos componentes del cristal, una banda de cerca de 20 kDa que podría estar relacionada con los bajos niveles de toxicidad alcanzados.

**6** Estequiometría de los cultivos de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

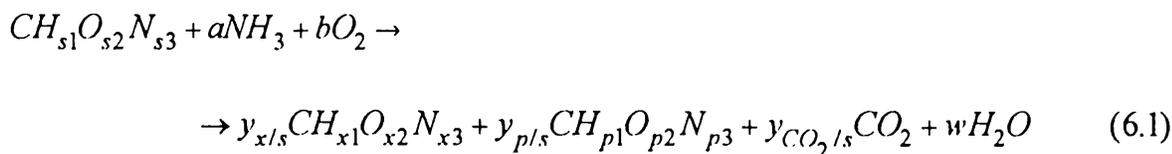
## 6.1. INTRODUCCION

Es posible estudiar los rendimientos de un proceso microbiano con el fin de determinar la relación entre el consumo del sustrato, la generación de ATP, la formación del material celular (biomasa) y la formación de producto(s). Durante el crecimiento hay relaciones fijas entre los rendimientos de biomasa y producto y los consumos de oxígeno, de nitrógeno y de sustrato, así como entre el consumo de oxígeno y la producción de calor.

La relación entre el empleo de sustrato, de fuente de nitrógeno y de oxígeno y la formación de biomasa, producto y  $\text{CO}_2$  puede obtenerse a partir de ecuaciones elementales de balance. Las bases de la teoría generalizada fueron establecidas por Minkevich y Eroshin (1973), y, aunque no siempre se presta suficiente atención a las relaciones estequiométricas existentes en los cultivos, su empleo se ha extendido a gran número de procesos microbianos.

Es posible escribir una fórmula del material celular según su composición elemental (Roels 1980). Para un gran número de microorganismos se ha encontrado que la fórmula  $\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$  es representativa. Por comodidad, sustratos y productos se expresan por medio de fórmulas que contienen 1 átomo-gramo de carbono, y se las llama carbono-mol (C-mol).

Puede, entonces, escribirse una ecuación de balance para el crecimiento de un microorganismo de composición *standard*, según:



Donde  $\text{CH}_{s1}\text{O}_{s2}\text{N}_{s3}$  representa un C-mol de fuente de carbono y energía,  $\text{CH}_{x1}\text{O}_{x2}\text{N}_{x3}$  un C-mol de biomasa y  $\text{CH}_{p1}\text{O}_{p2}\text{N}_{p3}$  un C-mol de producto.

El microorganismo crece a expensas de un C-mol de la fuente de carbono y energía, con amoníaco como fuente de nitrógeno y en presencia de oxígeno, para formar un producto, además de la biomasa, y liberar dióxido de carbono y agua como productos del metabolismo. Las fracciones de sustrato que se han convertido en biomasa, producto y dióxido de carbono se representan por  $y_{x/s}$ ,  $y_{p/s}$  y  $y_{CO_2/s}$

Por lo tanto, puede escribirse el balance de carbono:

$$y_{x/s} + y_{p/s} + y_{CO_2/s} = 1 \quad (6.2)$$

y el balance de nitrógeno:

$$y_{x/s} \cdot x_3 + y_{p/s} \cdot p_3 = a \quad (6.3)$$

Del mismo modo pueden establecerse balances para el resto de los elementos.

Minkevich y Eroshin (1973) incorporaron también la definición de grado de reducción  $\gamma$ , que corresponde al número de equivalentes de electrones que pueden transferirse desde un C-mol de sustrato hacia el oxígeno cuando es oxidado a dióxido de carbono, agua y amoníaco, lo cual se considera nivel de referencia. Este es tan sólo una cuestión de conveniencia, y los compuestos que lo integran no tienen, por definición, electrones disponibles ( $\gamma = 0$ ).

Mediante balances elementales, y asumiendo como nivel de referencia al indicado antes, se puede demostrar que:

$$\gamma_S = 4 + s_1 - 2s_2 \quad (6.4)$$

$$\gamma_X = 4 + x_1 - 2x_2 - 3x_3 \quad (6.5)$$

$$\gamma_P = 4 + p_1 - 2p_2 - 3p_3 \quad (6.6)$$

Puede, entonces, escribirse una ecuación de balance de grado de reducción para la ecuación de crecimiento de un microorganismo:

$$\gamma_S - 4b = \gamma_x \cdot Y_{x/s} + \gamma_P \cdot Y_{P/s} \quad (6.7)$$

O bien su equivalente

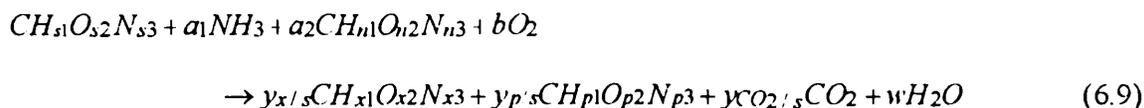
$$\frac{4b}{\gamma_S} + Y_{x/s} \frac{\gamma_x}{\gamma_S} + Y_{P/s} \frac{\gamma_P}{\gamma_S} = 1 \quad (6.8)$$

Estas ecuaciones pueden emplearse para la estimación de alguno de los coeficientes estequiométricos, a partir del conocimiento del resto de los mismos, o para el análisis de consistencia de resultados, conociendo los coeficientes estequiométricos experimentales. El tratamiento puede extenderse a cultivos con otros sustratos y/o fuentes de nitrógeno, en los cuales puede o no haber formación de productos.

**Cultivos de *Bacillus thuringiensis*.** Las características de los cultivos de *Bacillus thuringiensis* traen aparejadas ciertas complicaciones para el estudio de la estequiometría. Esto se debe a la formación del cristal de  $\delta$ -endotoxina y del esporo, así como a la necesidad de empleo de medios complejos. Aún así, es posible analizar la estequiometría de los cultivos en batch y en batch alimentado, con la limitación impuesta por la lisis que sufren las células luego de completarse la esporulación. Este fenómeno provoca la liberación del contenido celular al medio de cultivo, lo cual imposibilita el análisis de los productos formados durante el crecimiento.

En el caso de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* podría esperarse la presencia de ácido acético y de ácido pirúvico, teniendo en cuenta que su presencia ha sido informada en cultivos de *Bacillus cereus*, cuyo metabolismo es similar al que presenta *Bacillus thuringiensis*.

La presencia de fuentes de nitrógeno complejas (extracto de levadura) en los medios empleados en este trabajo obliga a extender el tratamiento presentado antes. Así, la ecuación de crecimiento se debe escribir como:



donde  $CH_{n1}O_{n2}N_{n3}$  representa a la fuente compleja de nitrógeno.

La fórmula del extracto de levadura puede estimarse como  $CH_2O_{0.61}N_{0.203}$ , según datos de Suzuki *et al.* (1985) corregidos según la composición del extracto de levadura empleado en este estudio.

De este modo, las ecuaciones de balance deberán convertirse en:

- Balance de carbono

$$y_{x/s} + y_{CO_2/s} + y_{p/s} - a_2 = 1 \quad (6.10)$$

- Balance de nitrógeno

$$\frac{s_3 \cdot y_{x/s} + p_3 \cdot y_{p/s}}{a_1 + a_2 \cdot n_3} = 1 \quad (6.11)$$

- Balance de grado de reducción

$$\frac{4b}{\gamma_s} + y_{x/s} \frac{\gamma_x}{\gamma_s} + y_{p/s} \frac{\gamma_p}{\gamma_s} - a_2 \frac{\gamma_{EL}}{\gamma_s} = 1 \quad (6.12)$$

La evaluación del nitrógeno consumido es realizada como nitrógeno total según Kjeldahl ( $\Delta N_{total}$ ) y como nitrógeno proveniente del amonio ( $\Delta N_{amonio}$ ), por lo que puede demostrarse que si

$$f_1 = \frac{\Delta N_{\text{amonio}}}{\Delta N_{\text{total}}} \quad (6.13)$$

scrá

$$a_1 = f_1 \frac{\Delta N_{\text{total}}}{\Delta S_{\text{total}}} \frac{30}{14} \quad (6.14)$$

Esta expresión permite calcular los átomo-gramos de nitrógeno consumidos, provenientes del amonio, por cada C-mol de sustrato consumido. Allí, 30 g es el peso de un C-mol de sustrato (glucosa), y 14 g es el peso de un átomo-gramo de nitrógeno.

Asimismo, puede calcularse el número de C-moles de carbono consumidos, provenientes de la fuente compleja de nitrógeno, según la expresión:

$$a_2 = \frac{\Delta N_{\text{total}}}{\Delta S_{\text{total}}} (1 - f_1) \times 30 \times 0.352 \quad (6.15)$$

En esta expresión, 0.352 C-mol corresponde a la cantidad de extracto de levadura que contiene 1 g de nitrógeno.

Haciendo uso de estas consideraciones pueden escribirse los balances de carbono, de nitrógeno y de grado de reducción para cultivos de *Bacillus thuringiensis* en medios con glucosa, extracto de levadura y sulfato de amonio.

## 6.2. MATERIALES Y METODOS

6.2.1. MICROORGANISMO Y MEDIOS DE CULTIVO. El microorganismo empleado y su medio de mantenimiento fueron descritos en la Sección 2.3.1.

6.2.2 CULTIVOS BATCH Y BATCH ALIMENTADO. Los cultivos batch fueron realizados en el medio X7 (Sección 3.3.1.3.) y los cultivos en batch alimentado exponencial (con valores de  $\mu$  de 0.1 y 0.5 h<sup>-1</sup>) se realizaron en las condiciones descritas en las Secciones 5.3.1.2b) y 5.3.1.2c). Los cultivos batch fueron estudiados hasta el momento de máxima producción de biomasa (25 h), y los cultivos batch alimentado hasta el final de la alimentación.

### 6.2.3. DETERMINACIONES ANALITICAS.

Las determinaciones analíticas fueron realizadas sobre las muestras iniciales y de máxima producción de biomasa (para los cultivos batch), y de final de alimentación (para los cultivos batch alimentado), en ninguna de las cuales se observó lisis celular. Esta estrategia fue empleada para evitar variaciones en las concentraciones de los parámetros durante los cultivos, las que podrían causar subevaluaciones. Sobre estas muestras se realizaron determinaciones de biomasa, glucosa remanente, nitrógeno total (Kjeldahl) y amonio remanente, tal como se describiera en Secciones anteriores. La determinación de la composición de los gases de salida del fermentador fue realizada con una mayor frecuencia que en los cultivos descritos en otras secciones, pues los cambios en las velocidades de consumo de oxígeno y de producción de dióxido de carbono son muy rápidos, lo que podría resultar en evaluaciones defectuosas del consumo y producción de esos gases. El consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono fueron evaluados como se describiera en Secciones anteriores.

#### 6.2.2.1. DETERMINACION DE ACIDOS ORGANICOS.

**Acido pirúvico.** La determinación de ácido pirúvico en los sobrenadantes de los medios de cultivo fue realizada mediante el método enzimático descrito por Czok y Lamprecht (1974). Este método se basa en la reducción del piruvato a lactato por la lactatodeshidrogenasa (LDH), reacción que es acompañada por la oxidación estequiométrica de NADH. La desaparición de NADH puede seguirse por medidas de la disminución de la absorbancia a 365 nm.

**Acido acético.** El ácido acético fue determinado mediante una adaptación del método de Hutchens y Kass (1949). Este método se basa en la reacción entre acetato y nitrato de lantano para formar acetato básico de lantano. Este es capaz de adsorber iodo, dando un color verde azulado, proporcional a la cantidad de acetato presente, que puede leerse en espectrofotómetro a 625 nm. La presencia de interferencias en los sobrenadantes de cultivo hacen necesario un tratamiento de desproteinización, previo a la separación del ácido acético de las muestras desproteinizadas por destilación por arrastre con vapor. El destilado se recoge en fracciones de 10 mL, donde se determina la concentración de ácido.

### 6.3. RESULTADOS Y DISCUSION

6.3.1. CULTIVO BATCH. En el cultivo batch realizado empleando el medio X7 se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 6.1.

Como puede verse, los balances de carbono y grado de reducción no cierran, mientras sí lo hace el balance de nitrógeno. Esto podría deberse a la formación de algún producto no nitrogenado. Este balance se realiza cuando se obtiene la máxima concentración de biomasa en el cultivo; esto es decir que el recuento de esporos en el cultivo es despreciable. El valor de  $Y_{x/s}$  alcanzado es de  $0.44 \text{ g.g}^{-1}$ , y el de  $Y_{x/o}$  es de  $1.05 \text{ g.g}^{-1}$ . Ambos coinciden con los hallados en otros cultivos en batch (ver Capítulo 3). No se detectó en los sobrenadantes la presencia de ácido pirúvico, mientras que la determinación de ácido acético no pudo llevarse a cabo. De todos modos, los equivalentes de álcali consumidos para mantener el pH constante fueron mayores que los equivalentes de ácido formados a partir del consumo de amonio, lo cual permite asumir la formación de algún ácido. Asimismo, dado que el balance de nitrógeno cierra, puede afirmarse que el producto formado no contiene nitrógeno.

**Tabla 6.1.** Resultados del análisis estequiométrico para un cultivo batch de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

| $\Delta XV$ | $\Delta SV$ | $\Delta N_t V$ | $\Delta N_a V$ | $\Delta PV$ | $\Delta O_2$ | $\Delta CO_2$ | $f_1$ | $a_1$ | $a_2$ | Balances |          |      |
|-------------|-------------|----------------|----------------|-------------|--------------|---------------|-------|-------|-------|----------|----------|------|
|             |             |                |                |             |              |               |       |       |       | C        | $\gamma$ | N    |
| 0.582       | 1.243       | 1.51           | 0.937          | nd          | 0.495        | 0.48          | 0.62  | 0.054 | 0.162 | 0.69     | 0.71     | 1.06 |

$\Delta XV$ : biomasa producida ( $\text{C-mol.l}^{-1}$ );  $\Delta SV$ : glucosa consumida ( $\text{C-mol.l}^{-1}$ );  $\Delta N_t V$ : nitrógeno total consumido ( $\text{g.l}^{-1}$ );  $\Delta N_a V$ : nitrógeno consumido proveniente del amonio ( $\text{g.l}^{-1}$ );  $\Delta PV$ : ácido acético producido ( $\text{C-mol.l}^{-1}$ );  $\Delta O_2$ : oxígeno total consumido ( $\text{mol.l}^{-1}$ );  $\Delta CO_2$ : dióxido total producido ( $\text{mol.l}^{-1}$ );  $f_1, a_1, a_2$ : ver texto. nd: no determinado.

6.3.2. CULTIVO BATCH ALIMENTADO EXPONENCIAL ( $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ). En este cultivo, realizado en las condiciones descritas antes, se obtuvieron los resultados que se presentan en Tabla 6.2. Los cultivos en batch alimentado, analizados al finalizar la alimentación, permiten ver que los balances de carbono, nitrógeno y grado de reducción cierran, dentro de los límites aceptables del error experimental (en general, los límites aceptados caen dentro del intervalo 0.93 - 1.07). Las concentraciones de ácidos acético y pirúvico no son detectables. Esto indica que no se ha formado producto en estos cultivos, o bien que, si se ha formado, el mismo ha sido consumido o mantenido dentro de la célula. La lisis celular no había comenzado en el momento de realizar los balances

**Tabla 6.2.** Resultados del análisis estequiométrico para un cultivo batch alimentado exponencial ( $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$ ) de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

| $\Delta XV$ | $\Delta SV$ | $\Delta N_t V$ | $\Delta N_a V$ | $\Delta PV$ | $\Delta O_2$ | $\Delta CO_2$ | $f_1$ | $a_1$ | $a_2$ | Balances |          |      |
|-------------|-------------|----------------|----------------|-------------|--------------|---------------|-------|-------|-------|----------|----------|------|
|             |             |                |                |             |              |               |       |       |       | C        | $\gamma$ | N    |
| 2.29        | 3.03        | 6.25           | 4.21           | <0.01       | 1.508        | 1.454         | 0.67  | 0.099 | 0.212 | 0.99     | 1.03     | 0.99 |

$\Delta XV$ : biomasa producida (C-mol);  $\Delta SV$ : glucosa consumida (C-mol);  $\Delta N_t V$ : nitrógeno total consumido (g);  $\Delta N_a V$ : nitrógeno consumido proveniente del amonio (g);  $\Delta PV$ : ácido acético producido (C-mol);  $\Delta O_2$ : oxígeno total consumido (mol);  $\Delta CO_2$ : dióxido total producido (mol);  $f_1, a_1, a_2$ : ver texto.

6.3.3. CULTIVO BATCH ALIMENTADO EXPONENCIAL ( $\mu=0.5 \text{ h}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos en este caso se presentan en Tabla 6.3. Los balances de carbono, de grado de reducción y de nitrógeno cierran, observándose producción de ácido acético. El ácido pirúvico, sin embargo, permanece por debajo de los límites de detección

**Tabla 6.3.** Resultados del análisis estequiométrico para un cultivo batch alimentado exponencial ( $\mu = 0.5 \text{ h}^{-1}$ ) de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

| $\Delta X_V$ | $\Delta S_V$ | $\Delta N_{tV}$ | $\Delta N_aV$ | $\Delta PV$ | $\Delta O_2$ | $\Delta CO_2$ | $f_1$ | $a_1$ | $a_2$ | Balances |          |      |
|--------------|--------------|-----------------|---------------|-------------|--------------|---------------|-------|-------|-------|----------|----------|------|
|              |              |                 |               |             |              |               |       |       |       | C        | $\gamma$ | N    |
| 0.848        | 0.895        | 2.39            | 0.681         | 0.416       | 0.275        | 0.253         | 0.285 | 0.054 | 0.672 | 1.06     | 1.1      | 1.06 |

$\Delta X_V$ : biomasa producida (C-mol);  $\Delta S_V$ : glucosa consumida (C-mol);  $\Delta N_{tV}$ : nitrógeno total consumido (g);  $\Delta N_aV$ : nitrógeno consumido proveniente del amonio (g);  $\Delta PV$ : ácido acético producido (C-mol);  $\Delta O_2$ : oxígeno total consumido (mol);  $\Delta CO_2$ : dióxido total producido (mol);  $f_1, a_1, a_2$ : ver texto.

#### 6.4. CONCLUSIONES.

Estos resultados indican que, creciendo a velocidades específicas de crecimiento cercanas al  $\mu_{max}$ , los cultivos de *Bacillus thuringiensis* acumulan ácido acético en concentraciones apreciables, tal vez debido a una “sobreoferta” de fuente de carbono y energía (*overflow metabolism*, según Tempest y Neijssel), mientras que en ningún caso hay acumulación de pirúvico. Al crecer a  $\mu$  menores, o bien no hay producción de ácido acético, o bien el ácido es consumido junto con la fuente de carbono debido a que han comenzado los eventos que llevan a la esporulación. Esto es lo observado en *Bacillus cereus* (Murrell 1967) donde el comienzo de la esporulación provoca una caída en la concentración de los ácidos orgánicos acumulados durante la fase exponencial.

## CONCLUSIONES GENERALES

A partir de los resultados presentados en este trabajo de Tesis se pueden extraer conclusiones que contribuirán a alcanzar un conocimiento más acabado de la microbiología y de la tecnología de cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

La necesidad de emplear medios complejos para cultivar *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* queda demostrada mediante los experimentos realizados empleando medios sintéticos (Capítulo 2). El desarrollo del microorganismo en estos medios es lento, y no es posible reemplazar la fuente de nitrógeno compleja por vitaminas y aminoácidos. También se demostró que los medios deben ser suplementados con amonio, con lo que se obtiene un aumento significativo en la producción de proteína tóxica.

Los experimentos en tanques agitados (Capítulo 3) permitieron determinar los parámetros de crecimiento del microorganismo, algunos de los cuales mostraron buena concordancia con datos de la literatura para otras variedades de *Bacillus thuringiensis*. Es posible emplear medios concentrados (siete veces la concentración del medio de referencia), observándose una cierta inhibición en el crecimiento. Medios de mayor concentración causan una mayor inhibición, con supresión de la esporulación y sin producción de toxina. Este efecto puede revertirse diluyendo los cultivos.

La aireación y la agitación afecta de modo sensible el crecimiento, la esporulación y la producción de toxina de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Capítulo 4). Se verifican variaciones importantes en los rendimientos cuando se estudian cultivos limitados y no limitados por oxígeno. La interrupción de la aireación provoca la supresión de la síntesis de toxina.

Los ensayos realizados en batch alimentado con distintas estrategias de alimentación (Capítulo 5) permiten ver que las condiciones iniciales del cultivo afectan la estabilidad del sistema de modo muy marcado. Asimismo, los cultivos alimentados con perfiles exponenciales muestran acumulación de glucosa, con lo que el control de la velocidad de crecimiento se imposibilita.

El consumo de nitrógeno en los cultivos lineales muestra diferencias respecto de los cultivos en batch. Los cultivos exponenciales indican que a mayor velocidad de alimentación, menor consumo de amonio.

La toxicidad alcanzada en los cultivos batch alimentado, cualquiera sea el perfil de alimentación, son un orden de magnitud menores que la alcanzada en cultivos batch. El perfil de polipéptidos componentes de los cristales con menor toxicidad presenta una banda de 20 kDa, que no se observa en los cristales obtenidos en cultivos batch.

Cuando se realiza el análisis estequiométrico de los cultivos (Capítulo 6) se observa que los cultivos batch y batch alimentado exponencial con velocidades de alimentación cercanas al  $\mu_{max}$  presentan acumulación de ácido acético. Los cultivos alimentados exponenciales a menores valores de  $\mu$  no presentan acumulación de ácido. Esta podría deberse a la sobreoferta de fuente de carbono y energía que se observa en los cultivos realizados a altos valores de  $\mu$ .

---

## 7 Referencias bibliográficas

---

- Abdel-Hameed, A.; Carlberg, G.; El-Tayeb, O. M. (1990). Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt - III. Selection of media for  $\delta$ -endotoxin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 6: 313 - 317.
- Abdel-Hameed, A.; Carlberg, G.; El-Tayeb, O. M. (1991). Studies on *Bacillus thuringiensis* H-14 strains isolated in Egypt - IV. Characterization of fermentation conditions for  $\delta$ -endotoxin production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 7: 231 - 236.
- Adams, L. F.; Visick, J. E.; Whiteley, H. R. (1989). A 20-kilodalton protein is required for efficient production of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* 27-kilodalton crystal protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 521 - 530.
- Ahmed, H. K.; Mitchell, W. J.; Priest, F. G. (1993). Catabolite repression of histidase biosynthesis in *Bacillus sphaericus* by acetate. *FEMS Microbiology Letters* 106: 71 - 76.
- Aiba, S.; Humphrey, A. E.; Millis, N. F. (1973). *Biochemical Engineering*, 2a edición. Academic Press: Nueva York.
- Allen, B. R.; Luli, G. W. (1987). A gradient - feed process for *E. coli* fermentations. *BioPharm*, Nov. 1987, 38 - 41.
- Aly, C., Mulla, M. S., Schnetter, W., Xu, B-Z. (1987). Floating bait formulations increase effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Anopheles* larvae. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* 3, 583 - 588.
- Andrews, R. E.; Bulla, L. A., Jr. (1981). Toxins of spore-forming bacteria. En: Levinson, H. S., Sonenshein, A. L., Tipper, D. J. (eds.) *Sporulation and Germination*. American Society for Microbiology: Washington; pp. 57 - 63.
- Angus, T. A. (1954). A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. *Nature (London)* 173: 545.
- Angus, T. A. (1956). Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. *Can. J. Microbiol.* 2: 122 - 139.
- Angus, T. A. (1956). Extraction, purification, and properties of *Bacillus sotto* toxin. *Can. J. Microbiol.* 2: 416 - 426.
- Angus, T. A. (1968). The use of *Bacillus thuringiensis* as a microbial insecticide. *World Rev. Pest Control* 7, 11 - 26.
- Anónimo (1987). *Vectobac - Biological larvicide*. Technical Manual, Abbot Laboratories, Illinois, Estados Unidos de América.
- Anónimo (1992). Bioinsecticides applied in health care. *Biotechnology and Development Monitor* 13 (Dic. 1992), 17.
- Aoki, K.; Chigasaki, Y. (1915). Über die Pathogenität der sog. Sotto-Bacillen (Ishiwata) bei Seidenraupen. *Mitt. Med. Fak. Kaiser. Univ. Tokyo* 13: 419 - 440.
- Arcas, J.; Yantorno, O. M.; Arrarás, E.; Ertola, R. J. J. (1984). A new medium for growth and  $\delta$ -endotoxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biotechnol. Lett.* 6: 495 - 500.
- Arcas, J.; Yantorno, O. M.; Ertola, R. J. J. (1987). Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. *Biotechnol. Lett.* 9, 105 - 110.

- Arcas, J. (1985). Producción de bioinsecticidas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Aronson, A. I. (1993). The two faces of *Bacillus thuringiensis*: Insecticidal proteins and post-exponential survival. *Mol. Microbiol.* 7, 489 - 496.
- Aronson, A. I.; Beckman, W.; Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1 - 24.
- Aronson, A. I.; Han, E-S; McGaughey, W.; Johnson, D. (1991). The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 981 - 986.
- Aronson, J. N.; Borris, D.P.; Doerner, J. F.; Akers, E. (1975).  $\gamma$ -aminobutyric acid pathway and modified TCA cycle activity during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* 30: 489 - 492.
- Backer, N., Margalit, J. (1993). Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. En: Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., Higs, S. (eds.) *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and Practice. J. Wiley: Chichester; cap. 7.
- Bailey, J. E.; Ollis, D. F. (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2ª Edición. McGraw-Hill, New York.
- Baumann, L.; Okamoto, K. Unterman, B.; Lynch, M. J.; Bauman, P. (1984). Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *J. Invertebr. Pathol.* 44: 329 - 341.
- Bechtel, D. B; Bulla, L. A., Jr. (1976). Electron microscopic study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis* *J.Bacteriol.* 127: 1472 - 1481.
- Becker, N; Ludwig, H. W. (1983). Mosquito control in West Germany. *Bull. Soc. Vector Ecol.* 8: 85 - 93.
- Berliner, E. (1915). Über die Schlafsucht der Mehlmotenrauppe (*Ephestia kühniella*, Zell.) ihren Erreger, *Bacillus thuringiensis* n. sp. *Zentralblatt Angew. Entomol.* 2: 29 - 56.
- Bhattacharya, M.; Plantz, B. A.; Swanson-Kobler, J. D.; Nickerson, K. W. (1993). Non-enzymatic glycosilation of Lepidopteran-active *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2666 - 2672.
- Bibilos, M., Andrews, R. E., Jr. (1988). Inhibition of *Bacillus thuringiensis* proteases and their effects on crystal toxin proteins and cell-free translations. *Can. J. Microbiol.* 34, 740 - 747.
- Borris, D. P.; Aronson, J. N. (1969). Relationship of L-alanine and L-glutamate dehydrogenases of *Bacillus thuringiensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 191, 716 - 718.
- Bridson, E. Y.; Brecker, A. (1970). Design and formulation of microbial culture media. In: J. R. Norris, D. W. Ribbons (eds.). *Methods in Microbiology*, vol 3A, pp. 229 - 295, Academic Press: London.
- Bulla, L. A., Jr.; Rhodes, R. A.; St. Julian, G. (1975). Bacteria as insect pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 29: 163 - 190.

- Bulla, L. A., Jr.; St. Julian, G.; Rhodes, R. A. (1971). Physiology of spore-forming bacteria associated with insects. III. Radiorespirometry of pyruvate, acetate, succinate, and glutamate oxidation. *Can. J. Microbiol.* 17: 1073 - 1079.
- Bulla, L. A., Jr.; Kramer, K. J.; Davidson, L. I. (1977). Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 130: 375 - 383.
- Bulla, L. A., Jr.; Bechtel, D. B.; Kramer, K. J.; Shethna, Y. I. Aronson, A. I. (1980). Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 8: 147 - 204.
- Bulla, L. A., Jr.; St. Julian, G.; Lipid metabolism during bacterial growth and sporulation: Phospholipid pattern in *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus popilliae*. In: H. O. Halvorson, R. Hanson, L. L. Campbell (eds.) *Spores V*. American Society for Microbiology, Washington; pp. 191 - 196.
- Bulla, L. A., Jr.; Bennett, G. A.; Shotwell, O. L. (1970). Physiology of sporeforming bacteria associated with insects. II. Lipids of vegetative cells. *J. Bacteriol.* 104: 1246 - 1253.
- Buono, F.; Testa, R.; Lundgreen, D. G. (1966). Physiology of growth and sporulation in *Bacillus cereus*. I. Effect of glutamic and other aminoacids. *J. Bacteriol.* 91: 2291 - 2299.
- Burges, H. D.; Hall, R. A. (1982). Bacteria and Fungi as insecticides. *Outlook on Agriculture* 11: 79 - 86.
- Cattani, J., Davidson, D., Engers, H. (1993). Malaria. En: *Tropical Diseases Research Progress 1991 - 1992*. Eleventh programme report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Geneva: World Health Organization; cap. 2.
- Cayuela, C.; Kai, K.; Park, Y. S.; Iijima, S.; Kobayashi, T. (1993). Insecticide production by recombinant *Bacillus subtilis* 1A96 in fed-batch culture with control of glucose concentration. *J. Ferment. Bioeng.* 75: 383 - 386
- Chang, C.; Yu, Y-M.; Dai, S-M.; Law, S. K.; Gill, S. S. (1993). High-level cryIVD and cytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kDa protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 815 - 821.
- Cheshire, F. R., Cheyne, W. W. (1885). Description of *Bacillus alvei* and its role in European foulbrood disease of the honey-bee. *J. R. Microscop. Soc.* 5, 581 - 601.
- Cheung, P. Y. C.; Buster, D.; Hammock, B. D.; Roe, R. M.; Alford, A. R. (1987). *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*  $\delta$ -endotoxin: Evidence of neurotoxic action. *Pesticide Biochem. Physiol.* 27: 42 - 49.
- Cheung, P. Y. C.; Hammock, B. D. (1985). Separation of three biologically distinct activities from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. *Curr. Microbiol.* 12: 121 - 126.
- Chilcott, C. N.; Ellar, D. J. (1988). Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* *in vivo* and *in vitro*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2551 - 2558.

- Choma, C. T.; Surewicz, W. K.; Carey, F. R.; Pozsgay, M.; Kablan, H. (1990). Secondary structure of the entomocidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* HD-73. *J. Prot. Chem.* 9: 87 - 94.
- Chow, E.; Singh, G. J. P.; Gill, S. S. (1989). Binding and aggregation of the 25 kDa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and aminoacid modifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2779 - 2788.
- Chunjatupornchai, W.; Höfte, H.; Seurinck, J.; Angsuthanasombat, C.; Vaeck, M. (1988). Common features of *Bacillus thuringiensis* toxins specific for Diptera and Lepidoptera. *Eur. J. Biochem.* 173: 9 - 16.
- Commandeur, P; Komen, J. (1992). Biopesticides: Options for biological pest control increase. *Biotechnology and Development Monitor* 13 (Dic 1992): 6 - 7.
- Convents, D.; Houssier, C.; Lasters, I.; Lauwereys, M. (1990). The *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. Evidence for a 2 domain structure of the minimal toxic fragment. *J. Biol. Chem.* 265: 1369 - 1375.
- Cooksey, K. E. (1971). The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: Biochemistry and mode of action. En: Burges, H. D., Hussey, N. W. (eds.). *Microbial control of insects and mites*. Academic Press: New York; pp. 247 - 274.
- Costilow, R. W.; Sylvester, C. J.; Pepper, R. E. (1966). Production and stabilization of cells of *Bacillus popilliae* and *Bacillus lentimorbus*. *Appl. Microbiol.* 14: 161 - 169.
- Couche, G. A.; Pfannenstiel, M. A.; Nickerson, K. W. (1987). Structural disulfide bonds in the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* protein crystal. *J. Bacteriol.* 169: 3281 - 3288.
- Crickmore, N.; Ellar, D. J. (1992). Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned CryIIA  $\delta$ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 6, 1533 - 1537.
- Czok, R., Lamprecht, W. (1974). Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. En: Bergmeyer, H. (ed.). *Methods of enzymatic analysis*. pp. 1446 - 1451.
- Davidson, E. W. (1992). Developments of insect resistance to biopesticides. *Pesqui. Agropec. Bras.* 23, 47 - 57.
- Dawes, I. W., Mandelstam, J. (1970). Sporulation of *Bacillus subtilis* in continuous cultures. *J. Bacteriol.* 103, 529 - 535.
- Dawes, I. W., Thornley, J. H. M. (1970). Sporulation in *Bacillus subtilis*. Theoretical and experimental studies in continuous culture systems. *J. Gen. Microbiol.* 62, 49 - 66.
- de Barjac, H; Sutherland, D. J. (eds.). *Bacterial control of Mosquitoes and Black Flies. Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus**. Rutgers University Press: New Brunswick, 1992.
- de Barjac, H., Bonnefoi, A. (1962). Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga* 7, 5 - 31.

- Delecluse, A.; Bourgouin, C.; Klier, A.; Rapoport, G.(1988). Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins encoded by two different genes, Mol. Gen. Genet. 214: 42 - 47.
- Delecluse, A.; Charles, J-F.; Klier, A; Rapoport, G. (1991) Deletion by in vivo recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. J. Bacteriol. 173: 3374 - 3381.
- Demain, A. L. (1958). Minimal media for quantitative studies with *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 75, 517 - 522.
- Dingman, D. W., Stahly, D. P. (1983) Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. Appl. Environ. Microbiol. 46, 860 - 869.
- Donovan, W. P.; González, J. M.; Gilbert, M. P.; Dankosik, C. (1988). Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. Mol. Gen. Genet. 214: 365 - 372.
- Dubois, N. R. (1968). Laboratory batch production of *Bacillus thuringiensis* and crystals. Appl. Microbiol. 16: 365 - 372.
- Dulmage, H. T., Aizawa, K. (1982). Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. En: Kurstak, E. (ed.) Microbial and viral pesticides. Marcel Dekker: Nueva York; pp. 209 - 237.
- Dulmage, H. T.; Correa, J. A.; Gallegos-Morales, G. (1990). Potential for improved formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* through standardization and fermentation development. En: H. de Barjac, D. Sutherland (eds.) Bacterial control of Mosquitoes and Black Flies. Biochemistry, Genetics and Applications of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*. Rutgers University Press: New Brunswick, cap. 7.
- Dunn, G. M. (1985). Nutritional requirements of microorganisms. En: M. Moo-Young (ed.) Comprehensive Biotechnology, vol. 1. Oxford: Pergamon Press; pp. 113 - 126.
- Dunn, I. J., Mor, J-R. (1975). Variable-volume continuous cultivation. Biotechnol. Bioeng. 17, 1805 - 1822.
- Dutky, S. R. (1959). Insect microbiology. Adv. Appl. Microbiol. 1, 175 - 200.
- Edwards, V. H., Gottschalk, M. J., Noojin, A. Y., Tuthill, L. B., Tannahill, A. L. (1970). Extended culture: the growth of *Candida utilis* at controlled acetate concentrations. Biotechnol. Bioeng. 12, 975 - 999.
- Egorov, N. S., Loriya, Zh. K., Yudina, T. G. (1984). Influence of aminoacids on the synthesis of exoprotease by *Bacillus thuringiensis*. Appl. Biochem. Microbiol. 19, 487 - 491.
- Eppstein, L., Shevitz, J., Yang, X-M., Weiss, S. (1989). Increased biomass production in a benchtop fermentor. Bio/Technol. 7, 1178 - 1181.
- Erickson, L. E., Minkevich, I. G., Eroshin, V. K. (1978). Application of mass and energy balance regularities in fermentation. Biotechnol. Bioeng. 20, 1595 - 1621.

- Esener, A. A., Roels, J. A., Kossen, W. F. (1981). Fed-batch culture: modeling and applications in the study of microbial energetics. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1851 - 1871.
- Faloci, M., M., Yantorno, O. M., Marino, H. A., Arcas, J.A., Ertola, R.J. (1990). Effect of the media composition on the growth parameters and biological properties of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin. *World J. Microbiol. Biotech.* 6, 32 - 38
- Faust, R. M., Abe, K., Held, G. A., Iizuka, T., Bulla, L. A., Meyers, C. L. (1983) Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Plasmid* 9, 98 - 103.
- Feitelson, J. S., Payne, J., Kim, L. (1992). *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/Technol.* 10, 271 - 275.
- Foda, M., Salama, H., Selim, M. (1985). Factors affecting growth physiology of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 50 - 52.
- Gelertner, W., Schwab, G. E. (1993). Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. En: Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., Higgs, S. (eds.) *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and Practice. J. Wiley: Chichester; cap. 4.
- Goldberg, L. J., Margalit, J. (1977). A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News.* 37, 355 - 358.
- González, J. M., Dulmage, H. T., Carlton, B. C. (1982). Correlation between specific plasmids and  $\delta$ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 5, 351 - 365.
- Hannay, C. L. (1953). Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. *Nature* 172, 1004.
- Hanson, R. S., Srinivasan, V. R., Halvorson, O. H. (1963) Biochemistry of sporulation. II. Enzymatic changes during sporulation of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 85, 45 - 50.
- Harrison, D., Pirt, S. J. (1967). The influence of dissolved oxygen concentration on the respiration and glucose metabolism of *Klebsiella aerogenes* during growth. *J. Gen. Microbiol.* 46, 193 - 211.
- Harwood, C. R. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biology and industrial workhorses. *Trends Biotechnol.* 10, 247 - 256.
- Hofte, H., Whiteley, H. R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53, 242 - 255.
- Holmberg, A., Sievanen, R., Carlberg, G. (1980). Fermentation of *Bacillus thuringiensis* for exotoxin production: Process analysis study. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1707 - 1724.
- Hutchens, J. O., Kass, B. M. (1949). A colorimetric microanalytical method for acetate and fluoroacetate. *J. Biol. Chem.* 177, 571 - 575.
- Kang, B. C., Lee, S. Y., Chang, H. N. (1992). Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* 14, 721 - 726.

- Karim, M. I. A., Lucas, R. J., Osborne, K. J., Rogers, P. L. (1993). The effect of oxygen on the sporulation and toxicity of *Bacillus sphaericus* 2362. *Biotechnol. Lett.* 15, 47 - 50.
- Kirby, W., Spence, W. (1826). An introduction to entomology: or elements of the natural history of insects. London: Longman, Rees, Orme, Brown and Green.
- Kleman, G. L., Strohl, W. R. (1992). High cell density and high-productivity microbial fermentation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3, 93 - 98.
- Klier, A., Parsot, C., Rapoport, G. (1983). In vitro transcription of the cloned chromosomal crystal gene from *Bacillus thuringiensis*. *Nucleic Acid Res.* 112, 3972 - 3987.
- Kole, M. M., Draper, I., Gerson, D. F. (1988). Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen-controlled, glucose fed-batch fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 404 - 408.
- Krywienzyk, J., Dulmage, H. T., Fast, P. G. (1977). Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3ab var. *kurstaki*. *J. Invertebr. Pathol.* 31, 373 - 375.
- Kuratsu, Y., Inuzuka, K. (1984). Correlative effect of aeration - agitation conditions and medium composition on colistin fermentation by *Bacillus polymyxa*. *Agric. Biol. Chem.* 48, 477 - 482.
- Lacey, L. A. (1985). *Bacillus thuringiensis* serotype H-14. *Amer. Mosq. Control Assoc. Bull.* 6, 132 - 158.
- Lacey, L. A., Inman, A. (1985). Efficacy of granular formulations of *Bacillus thuringiensis* (H14) for the control of *Anopheles larvae* in rice fields. *J. Amer. Mosq. Control Assoc.* 1, 38 - 42.
- Landén, R.; Bryne, M.; Abdel-Hameed, A. (1994). Distribution of *Bacillus thuringiensis* strains in Southern Sweden. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 45 - 50.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275.
- Lüthy, P., Cordier, J-L., Fischer, H-M. (1982). *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application. En: Kurstak, E. (ed.) *Microbial and viral pesticides*. Marcel Dekker: Nueva York; pp. 35 - 74.
- Lynch, M. J., Baumann, P. (1985) Immunological comparisons of the crystal protein from strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 46, 47 - 57.
- Machado-Allison, C. E. (1980). Ecología de los Mosquitos. I. Huevos y oviposición. *Acta Biol.* 10, 303 - 371.
- Machado-Allison, C. E. (1981). Ecología de los Mosquitos. II. Larvas y pupas. *Acta Biol.* 11, 51 - 129.
- Machado-Allison, C. E. (1982). Ecología de los Mosquitos. III. Adultos. *Acta Biol.* 12, 133 - 237.
- Martin, P. A. W., Travers, R. S. (1989). Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2437 - 2442.

- Martin, R. G., Felsenfeld, G. (1964). A new device for controlling the growth rate of microorganisms: the exponential gradient generator. *Anal. Biochem.* 8, 43 - 53.
- Mc Gaughey, W. H. (1985). Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229, 193 - 195.
- Mc Gaughey, W. H., Beeman, R. W. (1988). Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indian mealmoth (*Lepidoptera: Pyralidae*). *J. Econ. Entomol.* 81, 28 - 33.
- Meadows, M. P. (1993). *Bacillus thuringiensis* in the environment: Ecology and risk assessment. En: Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., Higgs, S. (eds.) *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and Practice. J. Wiley: Chichester; cap. 9.
- Medrano-Roldán, H., Velázquez, C. G., Robles, C. M., Pérez-Galindo, A., Correa, C. P., Rodríguez-Padilla, C., Tamez-Guerra, R., Galán-Wong, J. L. (1993). Relationship between rheological parameters at flask and pilot plant level for the production of bioinsecticides. *Ubamari (Rev. Inst. Tecnol. Durango)* 28, 3 - 11.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31, 426 - 428.
- Moon, S-H., Parulekar, S. J. (1991). A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 467 - 483.
- Moraes, I. O., Santana, M. H. A., Hokka, C. O. (1980). The influence of oxygen concentration on microbial insecticide production. En: Moo-Young, M. (ed.) *Adv. in Biotechnol. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Fermentation Symposium, London, Canada, vol. 2, pp. 75 - 79.*
- Murrel, W. C. (1967). The biochemistry of bacterial endospore. *Adv. Microbial. Physiol.* 1, 133 - 251.
- Nakata, H. M. (1964). Organic nutrients required for growth and sporulation of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 88, 1522 - 1524.
- Neijssel, O. M., Tempest, D. W. (1976). Bioenergetics aspects of aerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC418 in carbon-limited and carbon sufficient chemostat cultures. *Arch. Microbiol.* 107, 215 - 221.
- Nickerson, K. W. (1980). Structure and function of the *Bacillus thuringiensis* protein crystal. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1305 - 1333.
- Nickerson, K. W., Bulla, L. A., Jr. (1974). Physiology of spore forming bacteria associated with insects: Minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* 28, 124 - 128.
- Nickerson, K. W., Bulla, L. A., Jr. (1975). Lipid metabolism during bacterial growth, sporulation, and germination: an obligate nutritional requirement in *Bacillus thuringiensis* for compounds that stimulate fatty acids synthesis. *J. Bacteriol.* 123, 598 - 603.

- Nickerson, K. W., St. Julian, G., Bulla, L. A., Jr. (1974). Physiology of spore-forming bacteria associated with insects: Radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* 28, 129 - 132.
- Nomura, M. (1955). Studies on the autolytic phenomenon in *Bacillus subtilis*. I. The anaerobic lysis of *Bacillus subtilis*. *J. Agricultural Chem. Soc. Japan* 29, 674 - 682.
- Norris, J. R. (1964). The classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 27, 439 - 447.
- Ogarkov, V. I., Muratov, V. S., Myalkin, A. A., Igonin, Y. B., Dobokhotsky, O. N. (1989). Effects of the intensity of oxygen mass-exchange on the growth of *Bacillus thuringiensis* var. *dendrolimus* - effect of culture medium. *Biotekhnol. (trad. ing.)* 5, 164 - 167.
- Paige, M. R., Cooper, D. (1990). Scale-up of beta-exotoxin production in fed-batch *Bacillus thuringiensis* fermentations. *Proc. 5<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology, Copenhagen, July 8 - 13.*
- Park, Y. S., Kai, K., Iijima, S., Kobayashi, T. (1992). Enhanced  $\beta$ -galactosidase production by high-cell density culture of recombinant *Bacillus subtilis* with glucose concentration control. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 686 - 696.
- Pasteur, L. (1870) *Etudes sur la maladie des vers à soie, Tomes I et II.* Gauthier Villars: Paris.
- Pearson, D., Ward, O. P. (1988). Bioinsecticide activity, bacterial cell lysis, and proteolytic activity in cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 195 - 202.
- Pearson, D., Ward, O. P. (1988b). Effect of culture conditions on growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of media for production of the protein crystal endotoxin. *Biotechnol. Lett.* 10, 452 - 456.
- Pepper, R. E., Costilow, R. N. (1965). Electron transport in *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* 89, 271 - 176.
- Pirt, S. J. (1975). *Principles of Microbe and Cell cultivation.* Londres: Blackwell Scientific, cap. 9.
- Pirt, S. J. (1974). The theory of fed-batch culture with reference to the penicillin fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 24, 415 - 424.
- Priest, F. G. (1992). Biological control of mosquitoes and other biting flies by *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 357 - 369.
- Priest, F. G., Sharp, R. J. (1989) Fermentation of bacilli. En: Neway, J. O. (ed.) *Fermentation process development of industrial microorganisms.* Marcel Dekker: Nueva York; pp. 73 - 132.
- Pruett, C. J. H., Burges, H. D., Wyborn, C. H. (1980). Effect of exposure to soil on potency and spore viability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 35, 168 - 174.

- Rajalakshmi, S., Shethna, Y. I. (1977). The effect of aminoacids on growth, sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. J. Ind. Inst. Sci. 59, 169 - 176
- Rajalakshmi, S., Shethna, Y. I. (1980). Spore and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* during growth in cystine and cysteine. Biosci. 2, 321 - 328.
- Rawlins, S. C. (1989). Biological control of insects pests affecting man and animal in the tropics. CRC Crit. Rev. Microbiol. 16, 235 - 252.
- Rizzi, M., Klein, C., Schulze, C., Bui-Tahn, N., Dellweg, H. (1989). Xylose fermentation by yeasts. 5. Use of ATP balances for modelling O<sub>2</sub>-limited growth and fermentation of yeast *Pichia stipitis* with xylose as carbon source. Biotechnol. Bioeng. 34, 509 - 514.
- Roels, J. A. (1983). Energetics and kinetics in Biotechnology. Elsevier Biomedical: Amsterdam; cap. 3.
- Rogoff, M. H. (1966) Crystal-forming bacteria as insect pathogens. Adv. Appl. Microbiol. 8, 291 - 313.
- Roos, J. W., McLaughlin, J. K., Papoutsakis, E. T. (1985). The effect of pH on nitrogen supply, cell lysis, and solvent production in fermentations of *Clostridium acetobutylicum*. Biotechnol. Bioeng. 27, 681 - 694.
- Rowe, G. E. y Margaritis, A. (1987). Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 6, 87 - 127.
- Sakharova, Z. V., Ignatenko, Yu. N., Khovrychev, M. P., Lykov, V. P., Rabotnova, I. L., Shevtsov, V. V. (1984). Sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis* with growth limitation via the nutrient sources. Mikrobiol. (trad. ing.) 53, 221 - 227.
- Sakharova, Z. V., Ignatenko, Yu. N., Shchult's, F., Khovrychev, M. P., Rabotnova, I. L. (1985). Kinetics of the growth and development of *Bacillus thuringiensis* during batch culturing. Mikrobiol. (trad. ing.) 54, 483 - 488.
- Sakharova, Z. V., Rabotnova, I. L.; Khovrychev, M. P. (1989). Growth and spore formation in *Bacillus thuringiensis* at high substrate concentrations. Mikrobiol. (trad. ing.) 57, 794 - 797.
- Scherrer, P., Lüthy, P., Trumpi, B. (1973). Production of  $\delta$ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. Appl. Microbiol. 25, 644 - 646.
- Schulp, J. A., Stouthamer, A. H. (1970). The influence of oxygen, glucose and nitrate upon the formation of nitrate reductase and the respiratory system in *Bacillus licheniformis*. J. Gen. Microbiol. 64, 195 - 203.
- Schulz, V., Schorcht, R., Ignatenko, Yu. N., Sakharova, Z. V., Khovrychev, M. P. (1985). Modellgestützte optimierung der kontinuierlichen fermentation von  $\delta$ -endotoxin. Studia Biophys. 107, 43 - 51.
- Schumpe, A., Quicker, G., Deckwer, W-D. (1982). Gas solubilities in microbial culture media. En: Fiechter, A. (ed.) Adv. Biochem. Eng. 24, 1 - 38.

- Singer, S., Goodman, N. S., Rogoff, M. H. (1966). Defined media for the study of bacilli pathogenic to insects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 139, 16 - 23.
- Singer, S., Rogoff, M. H. (1968). Inhibition of growth of *Bacillus thuringiensis* by aminoacids in defined media. *J. Invertebr. Pathol.* 12, 98 - 104.
- Singh, R. H. M. M. (1971). Role of carbon and nitrogen sources in bacterial growth and sporulation. *Appl. Microbiol.* 22, 131 - 132.
- Smith, R. A. (1982). Effect of strain and medium variation on mosquito toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Can. J. Microbiol.* 28, 1089 - 1092.
- Smith, R. A. y Couche, G. A. (1991) The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 311 - 315.
- Smith, R. A. (1987). Use of crystal serology to differentiate among varieties of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 50, 1 - 8.
- St. Julian, G., Bulla, L. A., Jr. (1971). Physiology of spore-forming bacteria associated with insects. IV. Glucose catabolism in *Bacillus larvae*. *J. Bacteriol.* 108, 828 - 834.
- Strohl, W. R., Schlasner, S. M., Lorensen, P. L. (1986). Microcomputer-control of fermentation processes. *BioTechniques* 4, 336 - 343.
- Suzuki (1985)
- Tabashnik, B. E., Cushing, N. L., Finson, N y Johnson, N. W. (1990). Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondblack moth (*Lepidoptera: Plutelliae*). *J. Econ. Entomol.* 83, 1673 - 1676.
- Thorne, L., Garduno, F., Thompson, T., Decker, D., Zounes, M., Wild, M., Waldfield, A. y Pollock, T. (1986). Structural similarity between the Lepidoptera- and Diptera-specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subspp. *kurstaki* and *israelensis*. *J. Bacteriol.* 166, 801 - 811.
- Tojo, A., Aizawa, K. (1983). Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 576 - 580.
- Tompkins, G., Engler, R., Mendelsohn, M. y Hutton, P. (1990). Historical aspects of the quantitation of the active ingredient percentage for *Bacillus thuringiensis* products. En: Hickle, L. A. y Fitch, W. L. (eds.) *Analytical chemistry of Bacillus thuringiensis*, ACS Symposium Series 432, Washington: American Chemical Society, pp. 9 - 13.
- Travers, R. S., Martin, P. A. W., Reichelfelder, C. F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1263 - 1266.
- Travers, R. S., Faust, R. M., Reichelfelder, C. F. (1982),. Effects of oxygen on glucose utilization in *Bacillus popilliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 39, 236 - 237.
- Tyrrel, D. J., Bulla, L. A., Jr., Andrews, R. E., Kramer, K. J., Davidson, L. I., Nordin, P. (1981). Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Bacteriol.* 145, 1052 - 1062.

- Visick, J. E.; Whiteley, H. R. (1991). Effect of a 20 kDa protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on production of the CytA protein by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *173*, 1748 - 1756.
- Welsh, F. W., Williams, R. E., Veliky, I. A. (1987). Organic and inorganic nitrogen source effects on the metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *26*, 369 - 372.
- West, A. W., Burges, H. D., Dixon, T. J., Wyborn, C. H. (1985). Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: effects of pH, moisture, nutrient availability and indigenous microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* *17*, 657 - 665.
- Widner, W. R., Whiteley, H. R.. (1989). Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *J. Bacteriol.* *171*, 965 - 974.
- Yamamoto, T., Watkinson, I. A., Kim, L., Sage, M. V., Stratton, R., Akanda, N., Li, Y., Ma, D-P., Roe, B. A. (1988). Nucleotide sequence of the gene coding for a 130-kDa mosquitocidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Gene* *66*, 107 - 120.
- Yamamoto, T. (1983). Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high performance liquid chromatography. *J. Gen. Microbiol.* *129*, 2595 - 2603.
- Yamane, T., Kishimoto, M., Yoshida, F. (1976). Semi-batch culture of methanol-assimilating bacteria with exponentially increased methanol feed. *J. Ferment. Technol.* *54*, 229 - 240.
- Yamané, T., Shimizu, (1984). Fed-batch techniques in microbial processes. En: Fiechter, A. (ed.) *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, vol. 30; pp. 147 - 194.
- Yousten, A., Wallis, D. (1987). Batch and continuous cultures production of the mosquito larval toxin of *Bacillus sphaericus* 2362. *J. Ind. Microbiol.* *2*, 277 - 283.
- Zamola, B.; Kajfez, F. (1977). Biosynthesis of a microbial insecticide. Swiss Pat. 587014, June 1977.